

Department Biologie II
Anthropologie und Humangenetik
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchung molekularer Mechanismen,
die zur chromosomalen Instabilität
führen können**

Katrin Pfleghaar

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
eingereicht am 5. September 2006

**Untersuchung molekularer Mechanismen, die zur chromosomalen Instabilität
führen können**

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig Maximilians Universität München (LMU)

vorgelegt von

Dipl. Biol. Katrin Pfleghaar
aus München

Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Cremer

Prof. Dr. Elisabeth Weiss

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2006

Für meine Eltern

1	Einleitung	1
1.1	Formen der genetischen Instabilität	1
1.1.1	Mikrosatelliteninstabilität	2
1.1.2	Chromosomale Instabilität	3
1.2	Genetische Instabilität als treibende Kraft der Tumorentwicklung?	3
1.3	Modelle zur Entstehung der chromosomalen Instabilität	6
1.3.1	Entstehung der strukturellen chromosomalen Instabilität	6
1.3.2	Modelle zur Entstehung der numerischen chromosomalen Instabilität	7
1.4	Auf der Suche nach "CIN-Genen"	9
1.4.1	Das Anaphase-regulatorische Protein Securin	12
1.4.2	Die Ubiquitin-Ligase CDC4	15
1.5	Ziele der vorliegenden Arbeit	15
1.5.1	Langzeitanalysen von humanen Zelllinien mit Knockouts in hCDC4 und hSecurin	15
1.5.1.1	Langzeit Analyse der Knockout Zelllinie HCT116 hSecurin-/-	16
1.5.1.2	Langzeit Analyse der Knockout Zelllinien HCT116 hCDC4-/- und DLD1 hCDC4-/-	16
1.5.2	Vergleichende Genexpressionsanalysen verschiedener CIN und MIN Zelllinien	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Zelllinien:	18
2.1.2	Reagenzien	18
2.1.3	Primer	22
2.1.4	siRNA Oligos	23
2.1.5	Technische Geräte und Labormaterialien	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Kultivierung der Zelllinien	24
2.2.2	Herstellung der Präparate für M-FISH und Interphase-FISH Analysen	25
2.2.3	Vorbehandlung der Präparate für M-FISH und Interphase-FISH	25
2.2.4	Interphase FISH mit chromosomenspezifischen Zentromersonden	26
2.2.4.1	Amplifikation der Zentromersonden mit Insert-PCR	26
2.2.4.2	Markierung von Zentromersonden mittels Nicktranslation	27
2.2.4.3	Herstellung des Zentromersondenmixes	28
2.2.5	7 Fluorochrom Multiplex-FISH (M-FISH)	29
2.2.5.1	Herstellung von Whole Chromosome Painting Probes (WCP) für den 7 Fluorochrom M-FISH	29

2.2.5.1.1	Vorbereiten der DNA-Pools	29
2.2.5.1.2	PCR-Amplifikation der DNA-Pools.....	30
2.2.5.1.3	Markierung der DNA Pools mittels Label-DOP-PCR	31
2.2.5.1.4	DNase I Verdau.....	32
2.2.5.2	Vorbereiten des 7 Fluorochrom M-FISH Hybridisierungsmixes	33
2.2.6	Hybridisierung von Zentromer- oder WCP-Sonden auf vorbehandelte Präparate	34
2.2.7	Post Hybridisierung und Nachweis für M-FISH und Zentromersonden..	34
2.2.8	Auswertung.....	36
2.2.9	Spezifische PCR zur Überprüfung des Knockouts	37
2.2.9.1	DNA Isolation	37
2.2.9.2	Spezifische PCR	38
2.2.10	Analyse der Schwesterchromatiden Trennung.....	39
2.2.11	Auszählung von Mikronuklei	40
2.2.12	Genexpressionsanalysen.....	40
2.2.12.1	RNA Isolation	41
2.2.12.2	Synthese des cDNA Erststrangs	43
2.2.12.3	Zweitstrang cDNA Synthese	43
2.2.12.4	Markierung der Proben durch In-vitro Transkription	45
2.2.12.5	cRNA Reinigung	46
2.2.12.6	Fragmentierung der cRNA	47
2.2.12.7	Hybridisierung auf dem HG U133 Chip	47
2.2.12.8	Nachweis, Färbung.....	48
2.2.12.9	Scannen und Auswertung	48
2.2.13	Western Blot zur Quantifizierung von Separase.....	50
2.2.14	Separase Aktivitätsanalyse.....	50
2.2.15	siRNA Analysen.....	51
2.2.15.1	Überprüfung der Effizienz des Plk2 Knockdowns	52
2.2.15.1.1	Myc -Plk2 Plasmid Transfektion	52
2.2.15.1.2	Western Blot zum Nachweis des Myc-Plk2 Fusionsproteins..	53
3	Ergebnisse	54
3.1	Analyse von Securin Knockout-Zellen	54
3.1.1	7 Fluorochrom M-FISH Analysen.....	54
3.1.2	Interphase FISH Analysen mit chromosomenspezifischen Zentromersonden	58
3.1.3	Analyse der Schwesterchromatidentrennung.....	62
3.1.4	Spezifische PCR zur Überprüfung des Securin Knockouts	65

3.1.5	Separase-Quantifizierung	66
3.1.6	Separase-Aktivitätstest:	68
3.1.7	Genexpressionsanalysen von HCT116 und HCT116hSecurin-/- Zellen	70
3.1.8	siRNA Analysen.....	74
3.2	Analyse der Knockout Zelllinien HCT116 hCDC4-/- und DLD1 hCDC4-/-	79
3.2.1	Interphase FISH-Analysen mit Zentromersonden	79
3.2.2	Auszählung von Mikronuklei	82
3.2.3	Spezifische PCR zur Überprüfung des Knockouts	83
3.2.4	M-FISH Analysen der Knockoutzelllinie HCT116 hCDC4-/-	84
3.2.5	M-FISH- und Bänderungsanalysen der Knockoutzelllinie DLD1 hCDC4-/- /-	85
3.3	Vergleichende Analysen von chromosomal instabilen (CIN) Kolonkarzinomzelllinien und Kolonkarzinomzelllinien mit Mikrosatelliteninstabilität (MIN).....	86
3.3.1	Genexpressionsanalysen.....	86
4	Diskussion.....	89
4.1	Langzeitanalysen der Knockoutzelllinien HCT116 hSecurin-/-, HCT116 hCDC4-/- und DLD1 hCDC4-/-	90
4.1.1	Analysen der Knockoutzelllinie HCT116 hSecurin-/-	90
4.1.2	Analysen der Knockout Linien HCT116 hCDC4-/- und DLD1 hCDC4-/-	98
4.1.3	Relevanz der Analysen an den Knockoutsystemen von hSecurin und hCDC4 und mögliche weiterführende Studien	100
4.2	Vergleichende Genexpressionsanalysen zwischen kolorektalen CIN und MIN Zelllinien und siRNA Analysen	103
4.2.1	Vergleiche der Expressionsergebnisse mit Daten anderer Arbeiten....	104
4.2.2	Diskussion der Expressionsdaten	106
4.2.3	Mögliche weiterführende Studien	109
5	Zusammenfassung und Ausblick	111
6	Literaturverzeichnis	112
7	Publikationen.....	122
8	Danksagungen	123
9	Lebenslauf.....	125

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb	Abbildung
Bio	Biotin
bp	base pair (Basenpaar)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
CCD	Charged Coupled Device (hochsensitive digitale Kamera)
Cen	Zentromer
CGH	Comparative genomic hybridization (Vergleichende Genomische Hybridisierung)
Chr	Chromosom
CIN	Chromosomale Instabilität
Cy	Cyanin-Farbstoff
d.h.	das heißt
DAPI	4,6-Diaminidino-2-phenylindol
DEAC	Diethylaminocoumarin
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonucleic acid
DOP-PCR	Degenerate oligonucleotide-primed-PCR
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alteri / und andere
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
kb	Kilobasen
l	Liter
M	Mol/l
mb	Megabasen

M-FISH	Multiplex FISH
mg	Milligramm
MIN	Mikrosatelliteninstabilität
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
NaOAc	Natriumacetat
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunden
SSC	Sodiumchlorid/Sodiumcitrat
Std	Stunde
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA Puffer
U	Units/Einheiten
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
WCP	Whole Chromosome Paint(ing)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Für die Entwicklung von Tumortherapien ist es essentiell, die molekularen Ereignisse zu kennen, die eine normale Zelle befähigt, zu entarten und aus ihrem Gewebsverband auszubrechen. Da die Entartung einer Zelle jedoch keinem An/Aus Mechanismus folgt, sondern sich schrittweise entwickelt und sich in Veränderungen verschiedener regulativer zellulärer Vorgänge widerspiegelt, ist ein Tumor bei der Diagnose oft schon so weit fortgeschritten dass er verglichen mit dem normalen Gewebe eine unüberschaubare Anzahl an Veränderungen aufweist. Heute ist bekannt, dass einige dieser Veränderungen, die Mutationen in Tumorsuppressor- und Onkogenen, direkt an der Krebsentstehung beteiligt sind, andere sind jedoch möglicherweise nur Nebenprodukte der fortschreitenden Tumorentwicklung. Auf der Suche nach tumorfördernden Veränderungen richtet sich daher ein Augenmerk auf Merkmale, die Krebszellen von normalen Zellen abgrenzen und bereits in möglichst frühen Tumorstadien auftauchen. Ein gemeinsames Merkmal der meisten aggressiven humanen Tumoren ist die Instabilität ihres Genoms. Die Bedeutung der genetischen Instabilität für die frühe Tumorentwicklung wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert und bildete die Basis für eine Vielzahl von Studien. Im Vordergrund standen hierbei stets die Fragen, wie und wann genetische Instabilität sich entwickelt und ob sie essentiell für die Entstehung und Progression von Tumoren ist. In der vorliegenden Doktorarbeit wurden unterschiedliche Aspekte der genetischen Instabilität und ihre Auswirkung auf verschiedene kolorektale Zelllinien untersucht.

1.1 Formen der genetischen Instabilität

Die genetische Instabilität beschreibt einen abnormalen Zellstatus mit einer erhöhten Rate an genomischen Veränderungen, die in Form von Amplifikationen, Deletionen, strukturellen Umbauten und Aneuploidien auftreten können. Während massive Abweichungen von der normalen genetische Bandbreite in der menschlichen Entwicklung nur in seltenen Fällen geduldet werden und daher oftmals bereits im Embryonalstadium letal sind (z.B. Wapner et al., 2002), gelten solche Beschränkungen in Tumoren offenbar nicht. Vorherrschend in kolorektalen Tumoren sind zwei Formen der genetischen Instabilität, die Mikrosatelliteninstabilität und die chromosomale Instabilität.

1.1.1 Mikrosatelliteninstabilität

In etwa 15% der sporadischen kolorektalen Karzinomfälle, sowie beim "hereditären nicht polypösen Kolonkarzinom" (HNPCC), wird ein hohes Maß an Instabilität auf Nukleotidebene, vor allem in den Bereichen der repetitiven Mikrosatelliten, beobachtet. Strand et al. brachten diesen Phänotyp erstmals mit Genprodukten der Mismatch-Reparatur in Verbindung (Strand et al., 1993). Wie in Abbildung 1.1 dargestellt, entstehen die meisten Basenfalschpaarungen während der Replikation.

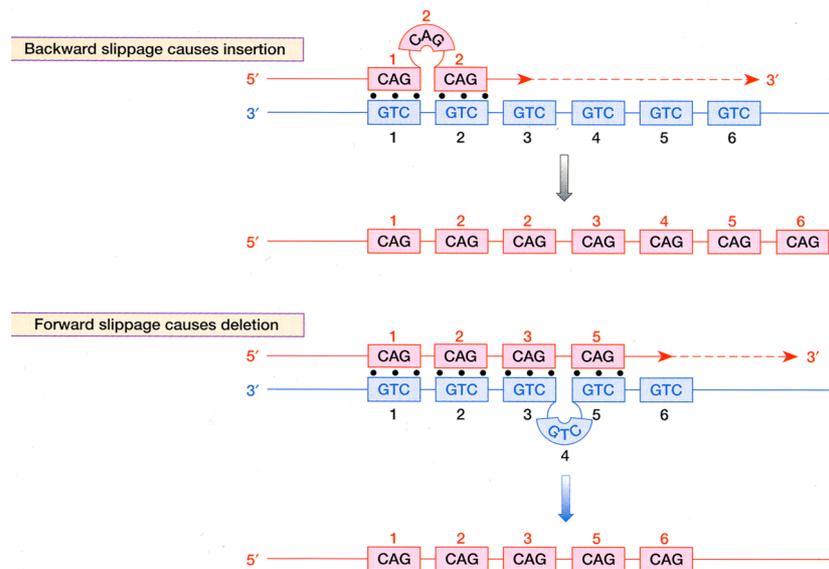


Abb 1.1: Entstehung von Insertionen und Deletionen während der Replikation (Strachan & Read, Human Molecular Genetics, 2003).

Die DNA-Bereiche, die eine hohe Dichte an repetitiven Sequenzen, den sogenannten "Mikrosatelliten" aufweisen, sind für diese Fehler besonders anfällig. In normalen Zellen können Falschpaarungen durch die Mismatch-Reparatur behoben werden. Dieses Reparatursystem besteht in menschlichen Zellen aus den Proteinen hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS1 und hPMS2 (Fishel et al., 1997; Bronner et al., 1994; Nicolaidis et al., 1994). Diese Genprodukte erkennen Fehlpaarungen während der Replikation, und leiten deren Reparatur ein. Fällt jedoch eines dieser Gene aus, treten im Genom bei jeder DNA Synthese kleine Deletionen und Insertionen auf, die sich besonders an den Bereichen der Mikrosatelliten bemerkbar machen. Patienten mit dem hereditären nicht polypösen Kolonkarzinom (HNPCC) haben bereits eine defekte Kopie eines Mismatch-Reparatur-Gens, vorwiegend hMLH1 und hMSH2, geerbt, die zweite geht zu irgendeinem Zeitpunkt verloren. Bei sporadischen Kolonkarzinomen wurden darüberhinaus auch epigenetische Mechanismen

beschrieben, bei denen ein Silencing durch Hypermethylierung der Promotoren für hMLH1 oder hMLH2 stattfindet, was schließlich zum gleichen Phänotyp führt (Kane et al., 1997; Veigl et al., 1998). Tumorzelllinien mit Mikrosatelliteninstabilität zeichnen sich durch einen sehr stabilen, meist fast diploiden, Karyotyp aus. Die Instabilität findet sich bei ihnen vorwiegend auf Nukleotidebene (Lengauer et al., 1997).

1.1.2 Chromosomale Instabilität

Die Mehrzahl aller aggressiven humanen soliden Tumore und etwa 85 % aller kolorektalen Tumoren sind hochgradig aneuploid (Heim & Mitelman, 1987). Diese Tumoren weisen eine hohe Frequenz von chromosomalen Gewinnen und Verlusten auf, welche mit zytogenetischen Methoden, wie der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) und Multiplex-Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (M-FISH), nachgewiesen werden können. Der Grad der Aneuploidie scheint in einigen Fällen mit dem Stadium des Tumors zu korrelieren, wobei fortgeschrittene Tumoren mit schlechter Prognose ein erhöhtes Ausmaß an chromosomalen Gewinnen und Verlusten zeigen (z.B. Risques et al., 2001). In einem typischen chromosomal instabilen (CIN) Tumor kommt es nach mathematischen Modellen in etwa einer von 5 Mitosen zum Gewinn oder Verlust mindestens eines Chromosoms (Lengauer et al., 1997). Anders als bei der Mikrosatelliteninstabilität, sind die molekularen Mechanismen, welche zur chromosomalen Instabilität in Tumoren führen, allerdings noch weitgehend unbekannt.

1.2 Genetische Instabilität als treibende Kraft der Tumorentwicklung?

Es stellt sich die Frage, ob die genetische Instabilität ein wichtiger Schritt in der Tumorevolution ist oder lediglich eine Konsequenz.

Zu den ersten Schritten der Tumorgenese bestehen zur Zeit alternative Modelle. Das monoklonale genetische Modell geht davon aus, dass die Entwicklung von einer normalen humanen Zelle zu einer Tumorzelle in ihrem Ablauf einer kleinen Evolution ähnelt, welche auf somatischer Ebene abläuft. Man geht davon aus, dass etwa 6 bis 12 Mutationen in Tumorsuppressor- und Proto-Onkogenen notwendig sind, die der entstehende Tumor ansammeln muss, um regulative Barrieren wie Apoptose und Proliferationshemmung, sowie physikalische Barrieren wie Gewebsgrenzen zu durchbrechen (Hanahan & Weinberg, 2000).

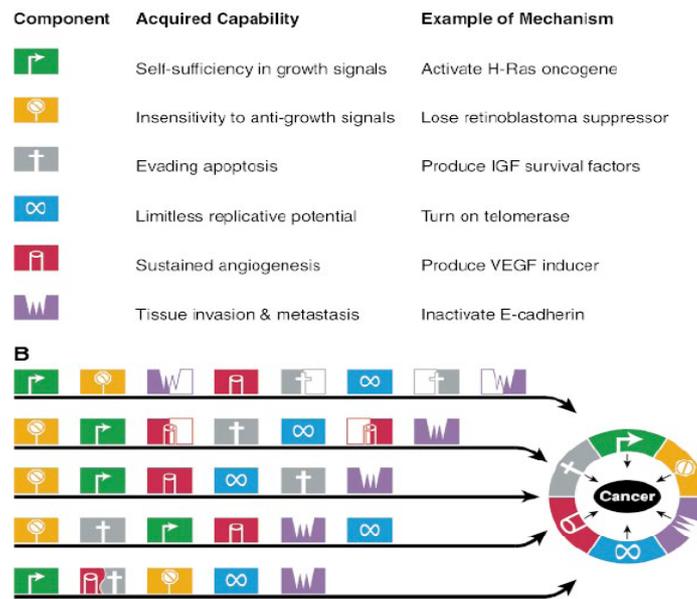


Abb 1.2: Die Meilensteine der Krebsentstehung (Hanahan und Weinberg, Cell, 2000)

Basierend auf der Hypothese von Nowell kann die erste zufällig auftretende Mutation in einem Tumorsuppressor- oder Onkogen der einzelnen Zelle einen Selektionsvorteil verschaffen, wodurch es zur klonalen Expansion dieser Zelle kommt (Nowell, 1976). Dieser Selektionsvorteil kann zum Beispiel darin bestehen, dass die Zelle nicht mehr auf äußere Wachstumsfaktoren angewiesen ist oder keine Proliferationshemmung mehr stattfinden kann (Abbildung 1.2). In dem neu entstandenen klonalen Zellverband können wiederum Mutationen auftreten, welche das Wachstum einer dieser Zellen weiter begünstigt. So kann es dem entstehenden Tumor Schritt für Schritt gelingen, Schutzsysteme auszuschalten, invasiv in umliegendes Gewebe einzudringen und sich selbst mit neuen Blutgefäßen zu versorgen.

Ein alternatives Modell basiert auf der Beobachtung, dass bereits in sehr frühen Tumorstadien und in benignen Vorformen epigenetische Veränderungen, wie DNA Hypo-oder Hypermethylierung zu finden sind. Nach dem "Epigenetic progenitor Model" ist der erste Schritt eine epigenetische Veränderung, die in einer Gruppe von Stammzellen eines bestimmten Gewebes auftritt (Abb. 1.3). Nach diesem Modell ist also der Ursprung des entstehenden Tumors polyklonal (Feinberg et al., 2006).

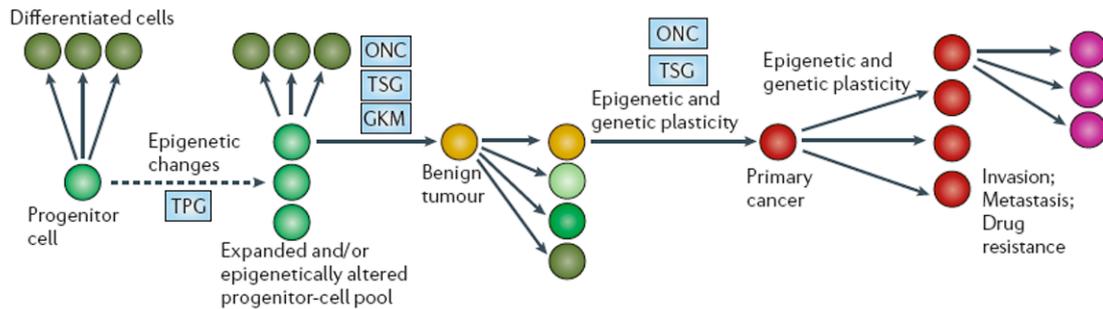


Abb 1.3: Das "Epigenetic Progenitor Model" für die polyklonale Entstehung eines Tumors (Feinberg et al., Nature Reviews Genetics, 2006).

Die genetische Instabilität könnte eine Strategie des entstehenden Tumors sein, um bereits in einem frühem Stadium die Mutationsrate zu erhöhen.

Sie erscheint besonders attraktiv, um zu erklären, warum Tumore überhaupt entstehen können, wenn sie mit einer normalen Mutationsrate von etwa 2×10^{-7} Mutationen/ Gen/ Zellteilung die notwendige Anzahl von Mutationen in Tumorsuppressor- und Proto-Onkogenen im begrenzten Zeitraum eines Menschenlebens anhäufen müssen. Basierend auf der Hypothese von Loeb gehen heute einige Gruppen davon aus, dass ein früher Schritt in der Tumorentstehung die Entwicklung eines sogenannten "Mutator Phänotyps" ist (Loeb, 1991). Durch Ereignisse, wie spontane Depurinierung oder DNA-Schäden durch oxidativen Stress, können nach diesem Modell Mutationen in Genen entstehen, die wichtig für die Erhaltung der genetischen Stabilität sind. Als Beispiele wurden von Loeb zunächst Reparatur- und Replikationsgene, später aber auch Gene, die eine Rolle bei der Chromatidensegregation spielen, genannt (Loeb 1991, Loeb 2001). Kinzler und Vogelstein erweiterten dieses Modell und unterscheiden zwischen sogenannten "Gatekeeper-" und "Caretakergenen". Während Mutationen in Gatekeepergenen essentiell für das Wachstum des entstehenden Tumors sind, führen Mutationen in Caretaker-Genen zur genetischen Instabilität (Kinzler & Vogelstein, 1997). Sobald ein Caretaker-Gen durch ein spontanes Ereignis ausgeschaltet ist, treten durch die entstandene Instabilität vermehrt Mutationen auf, die zufällig auch zum Funktionsgewinn (gain of function) von Onkogenen oder zur Inaktivierung (loss of function) von Tumorsuppressorgenen führen können und somit das Tumorstadium initiieren.

Dieses Modell ist jedoch nicht unumstritten. Tomlinson et al. gehen im Gegensatz dazu davon aus, dass ein "Mutator Phänotyp" für die Entstehung und Progression von Tumoren nicht zwingend vorliegen muss. Mittels verschiedener statistischer

Algorithmen konnte diese Gruppe errechnen, dass Mutationen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, jeweils gefolgt von klonaler Expansion, für eine maligne Transformation ausreichend sind (Tomlinson et al., 1996). Dem "Epigenetic Progenitor Model" zufolge entsteht die genetische Instabilität frühestens im dritten Schritt der Tumorentwicklung, nachdem ein "Gatekeeper" bereits inaktiviert ist.

Ein weiterer Aspekt der genetischen Instabilität ist, dass sie den Tumorzellen ein hohes Maß an Heterogenität verleiht. Diese Heterogenität könnte dem Tumor nützlich sein, um durch selektives Wachstum bestimmter Klone Resistenzen, beispielsweise gegen Chemotherapeutika, zu entwickeln. Um das Wachstum von Tumoren besser zu verstehen, ist es also in jedem Falle essentiell, die molekularen Mechanismen zu erforschen, die zur genetischen Instabilität führen.

Wie bereits erwähnt, sind die Ursachen der Mikrosatelliteninstabilität seit einigen Jahren bekannt. Anders sieht es bei der chromosomalen Instabilität aus. Es ist nicht nur unklar, ob die Aneuploidien, die in vielen Tumoren beobachtet werden, ein Grund oder vielmehr eine Konsequenz der Tumorentstehung sind, sondern ebenso, wie chromosomale Instabilität überhaupt zustande kommt.

1.3 Modelle zur Entstehung der chromosomalen Instabilität

Für die Entstehung von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen gibt es alternative Modelle. Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich hauptsächlich mit der Entstehung der numerischen chromosomalen Instabilität. Da sich diese beiden Formen jedoch keinesfalls ausschließen, soll zunächst kurz auf die Entstehung von strukturellen Aberrationen eingegangen werden.

1.3.1 Entstehung der strukturellen chromosomalen Instabilität

In den meisten Tumoren ist die antiproliferative Regulierung durch p53 und RB1 ausgeschaltet. Es ist bereits seit längerem bekannt, dass p53 durch eine kritische Verkürzung der Telomere, wie sie alterbedingt auftritt, aktiviert wird und die Apoptose einleitet. p53 defiziente Zellen können trotz kritisch verkürzter Telomere weiter proliferieren und ein Stadium, genannt "Crisis", erreichen. In diesem Stadium kann es an den ungeschützten Telomerenden durch einen sogenannten "Breakage-Fusion-Bridge Mechanismus" zur chromosomalen Instabilität, charakterisiert durch nicht reziproke Translokationen kommen (Artandi et al., 2000; Sharpless et al., 2004). In weiter fortgeschrittenen Läsionen wird durch eine Telomerase-Reaktivierung wieder eine gewisse Stabilität erreicht. Nach diesem Modell entsteht

die strukturelle chromosomale Instabilität, die einige epitheliale Tumoren kennzeichnet, in einem frühen Stadium, jedoch erst nach der Inaktivierung von Tumorsuppressorpathways wie den p53 Pathway.

1.3.2 Modelle zur Entstehung der numerischen chromosomalen Instabilität

Den Modellen zur Entstehung der numerischen chromosomalen Instabilität ist gemeinsam, dass sie davon ausgehen, dass es im Zuge der Zellteilung zu Störungen kommt, wodurch als Endprodukt aneuploide Tochterzellen entstehen.

Die Mehrzahl aller humanen soliden Tumore weist bereits in frühen Stadien numerische und strukturelle Centrosomenaberrationen wie zum Beispiel multipolare Spindeln auf (Nigg et al., 2002). Es wird daher seit Längerem diskutiert, ob Defekte im Centrosomenzyklus der initiale Auslöser für chromosomale Instabilität oder eher eine Konsequenz der fortschreitenden Tumorentwicklung sind. Zhou et al. zeigten, dass das Gen für STK15 (BTAK, Aurora2), dessen Genprodukt eine Centrosomen-assoziierte Kinase ist, in verschiedenen Tumorarten überexprimiert vorliegt, wodurch es zu abnormalen Centrosomenzahlen und möglicherweise zu Aneuploidien kommt (Zhou et al., 1998). Centrosomenaberrationen können entstehen, indem die Centrosomen sich verdoppeln, ohne dass die Zelle sich teilt (Modell I, Abb 1.4). Es ist jedoch auch vorstellbar, dass eine erhöhte Centrosomenzahl die Folge einer unvollständigen Zellteilung, möglicherweise ausgelöst durch Zytokinesedefekte, ist (Modell II, Abb 1.4). Ebenso könnten sie aus einer Zell-Zell Fusion resultieren (Modell III Abb 1.4). Modelle II und III würden jeweils zu einer tetraploiden Zelle mit einem doppelten Centrosomensatz führen, aus welcher wiederum aneuploide Tochterzellen entstehen könnten (Nigg et al., 2002).

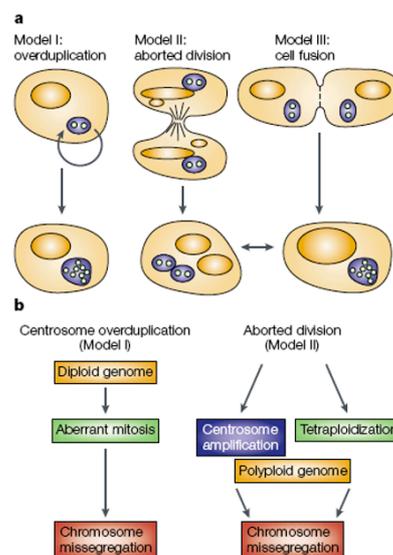


Abb. 1.4: Modelle zur Entstehung von Centrosomenaberrationen (Nigg et al., Nature Reviews Cancer, 2002)

Dass Tetraploidie oder, ganz allgemein, Polyploidie, schon eine Folge von Chromosomen-Missegregation ist, und das Tumorwachstum fördern kann, wurde erst kürzlich bewiesen. Shi und King konnten zeigen, dass Zellen auf Fehler bei der Chromatidensegregation (Nondisjunction Ereignisse) reagieren, indem sie während der Zytokinese die Zellwand nicht einziehen, wodurch statt zwei aneuploiden eine tetraploide Tochterzelle entsteht (Shi & King, 2005). Fujiwara et al. beschrieben wiederum, dass tetraploide Zellen mit erhöhter Frequenz aneuploide Tochterzellen mit Gewinnen und Verlusten ganzer Chromosomen, sowie Translokationen produzieren (Fujiwara et al., 2005).

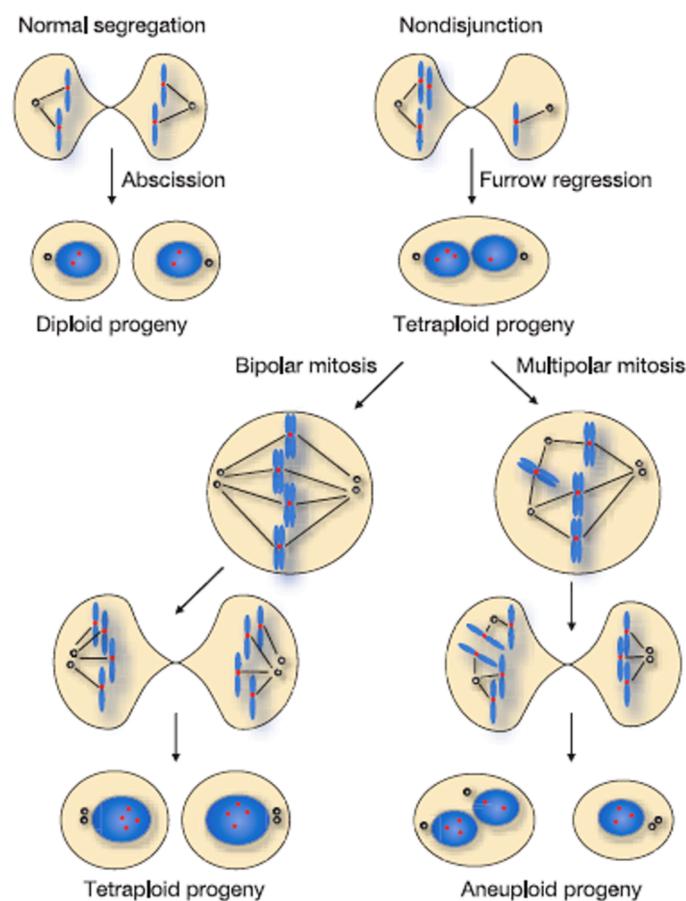


Abb. 1.5: Ausgelöst durch ein Nondisjunction-Ereignis entsteht eine tetraploide Zelle, die durch die erhöhte Anzahl an Centrosomen aneuploide Nachkommen produzieren kann (Shi & King, Nature, 2005).

Es ist derzeit noch unklar, mit welcher Frequenz tetraploide Zellen im menschlichen Körper auftreten, in kultivierten Zellen entstehen sie jedoch spontan. Ob es einen p53- abhängigen Checkpoint gibt, der polypleide Zellen eliminiert, wird derzeit noch kontrovers diskutiert (Margolis et al., 2003; Uetake et al., 2004; Wong et al., 2005).

Die meisten, beispielsweise kolorektalen, CIN Tumorzellen weisen einen hyperdiploiden Chromosomensatz mit 60 bis 90 Chromosomen auf, was dafür spricht, dass sie tatsächlich aus tetraploiden Vorläufern entstanden sind.

Zu Chromosomen Nondisjunction Ereignissen, die später, entweder direkt oder über den Umweg der tetraploiden Zelle, zu Aneuploidien führen, kann es durch Defekte in verschiedenen Stadien der Chromatidentrennung kommen.

Bei einer merotelischen Anheftung der Schwesterchromatiden beispielsweise ziehen Mikrotubulistränge von beiden Polen am Kinetochor eines Chromatids, wodurch dieses an der Metaphasenplatte zurückbleibt und nicht segregiert (Cimini et al., 2001).

Auch Defekte in der Regulation der Anaphase oder der Bildung und Spaltung von Cohesin, welches die Schwesterchromatiden zusammenhält können zu einer Nondisjunction führen.

1.4 Auf der Suche nach "CIN-Genen"

Nach der Caretaker-Gatekeeper Hypothese gibt es Gene, die so essentiell für die Erhaltung der genomischen Integrität, sind, dass ihr Ausfall zur genetischen Instabilität führt. Da gezeigt wurde, dass der Ausfall eines einzigen Mismatch-Reparaturgenes ausreicht, um Mikrosatelliteninstabilität auszulösen, lag die Vermutung nahe, dass auch für die Entstehung der chromosomalen Instabilität Kandidatengene zu finden sind. Potentielle "CIN Gene" wurden in den letzten Jahren von 2 Seiten aus gesucht. Einerseits wurden Tumore gezielt nach Mutationen in Genen gescreent, die in Modellsystemen wie Hefe mit einer erhöhten chromosomalen Instabilität einhergehen und direkt oder indirekt an der Chromatidensegregation beteiligt sind (z.B. Wang et al., 2004). Andererseits wurde an Knockout- und Knockdownsystemen getestet, ob ein Ausfall dieser Gene in diploiden Modellsystemen chromosomale Instabilität erzeugen kann. Ein Teil der so gefundenen potentiellen "CIN-Gene" ist in Abb. 1.6 aufgelistet.

Table 2
Chromosome segregation genes mutated in human cancers.

Dysregulated genes	Incidence in human tumors	Attributed function	Supporting evidence from cell-culture studies	Mouse model studies
<i>Non-checkpoint</i>				
APC	Familial adenomatous polyposis; other colorectal cancers [14]	Binds to the plus end of microtubules and kinetochores	[31,32**]	[2,39]
GSK3- β	Ovarian adenocarcinomas [40]	Mitotic spindle dynamics; chromosome alignment	N/A	N/A
Survivin	Human lung, colon, pancreas, prostate and breast cancers and high grade non-Hodgkin's lymphomas [41]	Chromosome passenger protein; anti-apoptotic factor	[42]	[43]
Ch-TOG1	Hepatic tumor [44]	Spindle assembly	[45]	N/A
HEC1	Carcinoma cell lines [46]	Kinetochores assembly	[46]	N/A
Securin/PTTG	Pituitary adenomas [47]	Sister chromatid cohesion	[48,49]	[50]
INCENP	Colorectal cancer cells [51]	Chromosome passenger protein	[51]	[52]
Plk1/Polo kinase	Primary colorectal cancers had elevated expression [53]	Mitotic entry; cytokinesis	[38]	N/A
AuroraA/Stk6/STK15/BTAK/Aurora2	Primary colorectal tumors and breast tumors [54,55]	Spindle assembly; mitotic entry	[56]	[57**]
<i>Mitotic checkpoint</i>				
AuroraB	Colorectal cancers [58]	Chromosome passenger protein; cytokinesis	[57**]	N/A
Mad1	Adult T cell leukemia [23]	Spindle checkpoint	[23]	N/A
Mad2	Ovarian cancer [59]	Spindle checkpoint	[58]	[25,28]
Bub1	Colorectal cancers [20,60]	Spindle checkpoint kinase	[61,62]	[36]
BubR1	Colon carcinomas [60]	Spindle checkpoint kinase	[61]	[26*,36]

Red text, overexpressed in tumors; green text, reduced level in tumors; N/A, not analyzed.

Abb. 1.6: Gene, die an der Chromatidensegregation beteiligt sind und in Tumoren in mutierter Form gefunden wurden (Draviam et al., Current Opinion in Genetics & Development, 2004).

In fast allen chromosomal instabilen Kolonkarzinomzelllinien werden Mutationen im "Adenomatosis Polyposis Coli" (APC) Gen nachgewiesen (Kaplan et al., 2001). Das Proteinprodukt dieses Gens ist im Wnt Signalweg am Abbau von β -Catenin beteiligt und spielt dadurch eine entscheidende Rolle bei der negativen Regulation der Zellvermehrung. In den letzten Jahren konnte zusätzlich gezeigt werden, dass APC direkt mit Mikrotubuli interagiert und, wahrscheinlich durch Assoziation mit dem Protein EB1, an der Chromatidensegregation beteiligt ist (Fodde et al., 2001). Green et al. konnten zeigen, dass eine Protein-verkürzende APC Mutation zur chromosomalen Instabilität in humanen Zelllinien führen kann (Green et al., 2005). Es ist also überaus wahrscheinlich, dass Mutationen des APC Gens teilweise für die Entstehung der chromosomalen Instabilität bei kolorektalen Karzinomen verantwortlich sind.

Eine kleine Gruppe der in Tumoren mutierten Gene, bilden die Komponenten des mitotischen Checkpoints. Die an diesem Checkpoint beteiligten Genprodukte wie BUB1, BUBR1, MAD1/2, Zw10, Zwilch, ROD verhindern in normalen Zellen, dass die

Anaphase stattfindet, bevor alle Kinetochore korrekt an Mikrotubulistränge angeheftet sind (Rieder et al. 1994; Li et al., 1996; Taylor & McKeon, 1997; Chan et al., 2000). Da gezeigt wurde, dass kolorektale CIN Tumorzelllinien nach Behandlung mit Spindel-hemmenden Agenzien nicht in der Lage sind, den Zellzyklus anzuhalten, wurde angenommen, dass Mutationen in mitotischen Checkpointgenen einen Auslöser der chromosomalen Instabilität darstellen. Zwar wurde dieser Befund später von Tighe et al. relativiert, jedoch ist davon auszugehen, dass einige chromosomal instabile Zelllinien einen funktionierenden aber weniger effektiven Spindel Checkpoint besitzen, als nicht-CIN-Zelllinien (Tighe et al., 2001). Mutationen in Checkpointgenen wurden nur sehr vereinzelt in Tumoren nachgewiesen (Cahill et al., 1998) jedoch wurden aufgrund dieser Befunde eine Reihe von Analysen an humanen- und Mauszellen durchgeführt, um die Auswirkungen von Knockouts und Knockdowns von Checkpointgenen auf die chromosomale Stabilität zu untersuchen. Humane Fibroblasten mit einem Knockdown des Gens BUB1 zeigen beispielsweise eine signifikant erhöhte Anzahl aneuploider Zellen, jedoch führt diese nach Injektion der Zellen in Nacktmäuse offenbar nicht zu vermehrter Tumorbildung (Musio et al., 2003). Ein kompletter Ausfall oder stark erniedrigte Level eines der Checkpointgene führen im Mausversuch meist nach kurzer Zeit zum Absterben des Embryos, wodurch eine Aussage über die Bedeutung dieser Gene für die Tumorentstehung erschwert wird (Baker et al., 2004). Mäuse mit reduzierten Leveln an Mad2, BubR1 oder Bub3 hingegen zeigen, durch Haploinsuffizienzeffekte eine stark erhöhte Frequenz aneuploider Fibroblasten, jedoch nur eine leicht erhöhte Anfälligkeit für Tumore (Michel et al., 2001; Babu et al., 2003; Dai et al., 2004).

Die Aussagen über die Bedeutung des mitotischen Checkpoints bei der Entstehung eines CIN-Phänotyps werden durch die Doppelfunktionen, die ein Teil dieser Genprodukte in der Zelle spielen, weiter erschwert (z.B. Campbell et al., 2001). Obwohl Mutationen in den genannten Checkpointgenen in Tumoren nicht besonders häufig auftreten, wird in späten Stadien einiger Tumoren eine veränderte Genexpression beispielsweise von MAD2 beobachtet. Diese Expressionsunterschiede erklären sich teilweise dadurch, dass häufig mutierte Onko- oder Tumorsuppressorgene, wie BRCA1, teilweise direkte Regulatoren von Checkpointgenen sind (z.B. Wang et al., 2004). So könnte es durchaus sein, dass chromosomale Instabilität, ausgelöst durch Checkpointdefekte, teilweise erst in fortgeschrittenen Tumorstadien entstehen und somit nicht der initiale Auslöser für die Tumorentwicklung nach der Mutator-Hypothese sind.

In einer Vielzahl von Neoplasien und Tumorzelllinien wurde eine Überexpression des Anaphase-regulatorischen Onkogens hSecurin (PTTG1) beobachtet (Pei & Melmed, 1997; Boelaert et al., 2003), welche nachweislich auch direkt mit der Aggressivität der Tumoren korreliert (Solbach et al., 2004). Ein weiteres Gen, welches in Tumoren häufig in mutierter Form vorliegt ist die E3 Ubiquitin Ligase hCDC4 (Rajagopalan et al., 2004; Kemp et al., 2005). Sowohl zu hCDC4, als auch zu hSecurin gibt es Knockoutstudien, die die Bedeutung der Gene für die Erhaltung der chromosomalen Stabilität hervorheben (Jallepalli et al., 2001, Rajagopalan et al., 2004). Diese Arbeiten an hSecurin und hCDC4 bilden die Basis eines Themenkomplexes der vorliegenden Arbeit. Daher soll im Folgenden näher auf die beiden Proteine, sowie die Knockoutstudien eingegangen werden.

1.4.1 Das Anaphase-regulatorische Protein Securin

Das zellzyklusregulatorische Protein Securin wurde zunächst als PDS1 in Hefe entdeckt (Yamamoto et al., 1996) und mit dem Anaphasenübergang in Verbindung gebracht. Heute ist bekannt, dass Securin, auch bei höheren Eukaryonten bis hin zum Menschen, als negativer Regulator der Schwesterchromatidentrennung funktioniert (Zou et al., 1999; Leisman, 2000; Jager et al., 2001). Während der Replikation werden nicht nur die Chromatiden verdoppelt, sondern auch ein Cohesin-Komplex aufgebaut, welcher die Schwesterchromatiden zusammenhält (Guacci, 1997; Michaelis, 1997). Dieser Eiweißkomplex besteht aus den vier Untereinheiten SCC1, SCC3, SMC1 und SMC3 und bildet eine sehr stabile kreisförmige Struktur, von der angenommen wird, dass sie das Chromosom, wie ein Ring, umschließt (Gruber, 2003).

Um die Chromatiden im Zuge der Zellteilung zu trennen, muss der Cohesinring aufgebrochen werden. Die Spaltung von Cohesin humaner Zellen erfolgt in zwei Schritten. (Losada et al., 1998; Waizenegger et al., 2000). Bereits während der späten G2-Phase wird die α Kleisin-Untereinheit SCC3-SA durch die mitotischen Kinasen Aurora B und Polo-like Kinase1 (Plk1) hyperphosphoryliert (Alexandru et al., 2001).

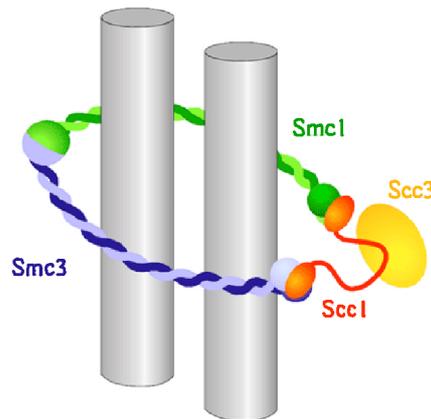


Abb. 1.7: Cohesin umschließt ringförmig die Schwesterchromatiden (Haering, Sciencemag, 2004).

Diese Phosphorylierung, der sogenannte "Prophase Pathway", führt dazu, dass das Cohesin entlang der Chromosomenarme zu diesem Zeitpunkt bereits dissoziiert, wodurch die typische 2-armige Struktur der metaphasischen Chromosomen entsteht (Waizenegger et al., 2000). Die Schwesterchromatiden bleiben jedoch, bis zum Beginn der Anaphase, durch ihr zentromerisches Cohesin verbunden. Bis vor Kurzem war noch nicht klar, was dieses verbleibende zentromerische Cohesin vom Cohesin der Chromatidenarme unterscheidet, bzw. warum hier keine Dissoziation durch Phosphorylierung stattfindet. Vor einem Jahr wurde jedoch ein humanes Protein namens Shugoshin (Sgo1) entdeckt, welches, an Zentromere gebunden, die Cohesin Spaltung bis zum Beginn der Anaphase verhindert (McGuinness et al., 2005; Stemmann et al., 2005).

Sobald alle Chromosomen an der Metaphasenplatte angeordnet sind und sich an den Kinetochoren die Spannung zwischen den Mikrotubuli beider Pole aufgebaut hat, wird die E3 Ubiquitin Ligase APC (Anaphase Promoting Complex) über den Abbau des inhibitorischen Proteins MAD2 aktiviert. Gemeinsam mit seinem Co-Faktor Cdc20 wirkt der APC-Komplex teilungsfördernd, indem er einige Proteine, mit Anaphase-inhibitorischen Funktionen, wie Cyclin B1, Securin und Shugoshin proteolytisch degradiert (King et al., 1996; Ciosk et al., 1998 ; Yanagida, 2000; Salic et al., 2004; Watanabe et al., 2004). Diese durch APC vermittelte Proteolyse ist Voraussetzung für die Cohesinspaltung an den Zentromeren. Anders als an den Chromatidenarmen, wird das zentromerische Cohesin von einer Cystein Endopeptidase gespalten, die aufgrund ihrer Funktion als molekulare Schere, den Namen "Separase" trägt (Uhlmann et al., 1999; Hauf et al., 2001). Um sicherzustellen, dass Separase Cohesin erst spaltet, sobald alle Chromosomen richtig und vollständig angeordnet sind, liegt Separase während des restlichen Zellzyklus an eines von zwei inhibitorischen Proteinen, Securin und Cyclin dependent

Kinase 1 (CDK1) gebunden vor. Securin interagiert direkt mit dem N- und möglicherweise auch dem C-Terminus der Separase (Hornig, 2002; Viadiu, 2005). Die Hemmung durch CDK1 entsteht hingegen durch eine inhibitorische Phosphorylierung von Separase Serin 1126 (Stemmann et al., 2001). Obwohl sich die Bindungsstellen der beiden Proteine nicht überlappen, bindet pro Separase Protein nur eines der beiden (Gorr et al., 2005). Sowohl Securin, als auch die regulatorische Untereinheit von CDK1 (Cyclin B1) werden zu Beginn der Anaphase durch den APC degradiert und geben hierdurch Separase frei. Erst durch eine aktivierende Selbstspaltung jedoch, kann Separase seine volle proteolytische Wirkung entfalten und die Cohesin Untereinheit SCC1 schneiden, wodurch es schließlich zur vollständigen Trennung der Schwesterchromatiden kommen kann.

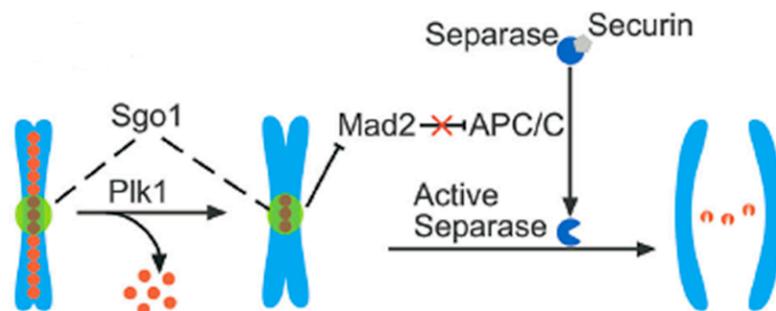


Abb. 1.8: Zwei Schritte der Schwesterchromatidentrennung (McGuinness et al., PLoS Biology, 2005)

Da Securin, aufgrund seiner Funktion einen guten Kandidaten für ein "CIN-Gen" abgab, untersuchten Jallepalli et al. die Auswirkungen eines Securin Knockouts in der chromosomal stabilen MIN-Zelllinie HCT116 (Jallepalli et al., 2001). Sie konnten zeigen, dass Zellen ohne Securin ein abnormales Teilungsverhalten mit Nondisjunction-Strukturen aufwiesen und daraus resultierend chromosomal instabil wurden. Die chromosomale Instabilität äußerte sich hauptsächlich durch Verluste ganzer Chromosomen und einer erhöhten Anzahl an Mikronuklei. Es konnte mit Westernblot-Analysen nachgewiesen werden, dass in Zellen ohne Securin nicht nur wesentlich weniger Separase Protein vorliegt, sondern, dass diese Separase ihr Substrat SCC1 auch nur ineffektiv schneidet. Die Autoren schlugen eine Chaperon Funktion von Securin für Separase vor, welche eine gute Erklärung für die beobachteten Chromatidensegregationsdefekte darstellte.

1.4.2 Die Ubiquitin-Ligase CDC4

Das Proteinprodukt des CDC4 Gens ist eine evolutionär konservierte E3 Ubiquitin-Ligase, die Proteine für die Degradierung markiert und am G1/S Zellzyklus Checkpoint beteiligt ist. Eines dieser Proteine ist die regulatorische Untereinheit von Cdk2, Cyclin E (Koepp et al., 2001). Erhöhte Cyclin E-Level wurden in einer Vielzahl von humanen Tumoren nachgewiesen (Courjal et al., 1996) und führen in Versuchen mit verschiedenen Zelllinien zu chromosomaler Instabilität (Spruck et al., 1999). Da in einigen Tumoren auch Mutationen des hCDC4-Gens beobachtet wurden, lag die Vermutung nahe, dass auch der Ausfall dieses Genes, möglicherweise über die fehlende Regulation von Cyclin E, mit einer erhöhten Aneuploidienrate einhergeht. Aus diesem Grund untersuchten Rajagopalan und Kollegen die Auswirkungen eines CDC4 Knockouts auf die chromosomale Stabilität humaner MIN-Zelllinien (Rajagopalan et al., 2004). Um zu testen, ob das CDC4-Genprodukt in direktem Zusammenhang mit der chromosomalen Instabilität von frühen Tumoren steht, wurde dieses Gen durch homologe Rekombination in zwei verschiedenen Zelllinien (HCT116 und DLD1) mit stabilem diploiden Karyotyp ausgeschaltet. Dieser Knockout resultierte in einer leicht erhöhten chromosomalen Instabilität und einer erhöhten Frequenz an Mikronukleusformationen. Dieser Phänotyp wurde als Konsequenz einer Deregulation von Cyclin E bewertet.

1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit

1.5.1 Langzeitanalysen von humanen Zelllinien mit Knockouts in hCDC4 und hSecurin

Die beiden vorgestellten Arbeiten an hSecurin- und hCDC4- Knockoutzelllinien zeigten, dass es prinzipiell möglich ist, mit einer Mutation in nur einem einzigen regulativen "CIN-Gen" die chromosomale Stabilität in diploiden Zellen aufzuheben. Wichtig ist jedoch auch zu erforschen, ob chromosomale Instabilität lange genug aufrecht erhalten werden kann, um Mutationen in Tumorsuppressor- und Onkogenen zu begünstigen. Gerade bei dem Auftreten von chromosomalen Verlusten teilweise sogar beider homologer Chromosomen, die nach dem Ausfall von hSecurin und hCDC4 beobachtet wurden, stellt sich die Frage, wie lange instabilen Zellen ein Überleben möglich ist. Es ist vorstellbar, dass Zellen Schutzsysteme besitzen, die ihr Genom beim Ausfall wichtiger regulativer Gene vor Chromosomenverlusten bewahren. Um zu untersuchen, wie Zellen nach dem Ausschalten eines regulativen Gens auf die chromosomale Instabilität langfristig reagieren und ob Backup

Mechanismen existieren und angeschaltet werden, wurden in der vorliegenden Dissertation Langzeitanalysen der Knockoutzelllinien hCDC4 und hSecurin-/- durchgeführt.

1.5.1.1 Langzeit Analyse der Knockout Zelllinie HCT116 hSecurin-/-

Die Securin Knockout Zelllinie war für die Langzeitanalysen besonders interessant, da sie in der Arbeit von Jallepalli et al. einen eindeutigen Phänotyp mit massiven chromosomalen Verlusten zeigte (Jallepalli et al., 2001). Zunächst wurden Fluoreszenz in-situ Hybridisierungstechniken (M-FISH und Interphase FISH) angewandt, um zu analysieren, ob auch mit steigender Passagezahl der Knockout Zelllinie noch chromosomale Instabilität nachgewiesen werden kann.

Anschließend wurde mit einem immunhistochemischen Verfahren das Teilungsverhalten der beiden Zelllinien während Ana- und Telophasen visualisiert, um auf Segregationsdefekte zu testen. Es wurde außerdem geprüft, ob die biochemischen Defekte mit reduzierten Mengen an Separase und verminderter Separaseaktivität, die von Jallepalli et al. für den instabilen Phänotyp verantwortlich gemacht wurden, auch in späten Passagen der Knockout-Zelllinie noch vorhanden sind. Da die Versuche zeigen konnten dass die Knockout-Zelllinien sich auf chromosomaler Ebene bereits nach wenigen Passagen stabilisierten obwohl die biochemischen Defekte immernoch bestanden, wurden vergleichende Genexpressionsanalysen der Wildtyp- und stabilen Knockoutzelllinie durchgeführt, um mögliche Backup-Mechanismen zu identifizieren, die bei einem Ausfall von Securin angeschaltet werden. Diese Analysen gaben Hinweise auf mögliche Kandidatengene für redundante Systeme bei einem Securinausfall. Eines dieser Gene, Plk2, wurde mittels siRNA Analysen auf seine Rolle bei der Schwesterchromatidentrennung hin untersucht.

1.5.1.2 Langzeit Analyse der Knockout Zelllinien HCT116 hCDC4-/- und DLD1 hCDC4-/-

Um zu testen, ob die chromosomale Instabilität auch beim Knockout anderer "CIN-Gene" in stabilen MIN-Linien nur ein transienter Effekt ist, wurde zusätzlich das hCDC4-Knockout System untersucht. Hierfür standen zwei Zelllinien zur Verfügung (HCT116 und DLD1), in denen das Gen hCDC4 durch homologe Rekombination ausgeschaltet wurde (Rajagopalan et al., 2004). Die Analysen dieser Zelllinien beinhalteten Interphase-FISH-Experimente, statistische Mikronuklei Auszählungen, M-FISH und Bänderungsanalysen.

1.5.2 Vergleichende Genexpressionsanalysen verschiedener CIN und MIN Zelllinien

Abgesehen von den bereits beschriebenen genetischen Unterschieden, weisen CIN- und MIN Tumorzelllinien auch weitere Charakteristika auf, die es ermöglichen, diese beiden Klassen zu trennen. MIN-Tumoren beispielsweise entstehen oftmals im proximalen Kolon, wohingegen CIN-Tumoren eher im distalen Bereich gefunden werden (z.B. Lindblom et al., 2001). In Tumoren beider Klassen wird häufig eine Aktivierung der Wnt-Signalkaskade beobachtet, jedoch resultiert diese meist aus unterschiedlichen Mutationen. Während in kolorektalen CIN-Tumoren häufig eine inaktivierende Mutation im APC-Gen vorliegt, sind MIN-Tumore eher durch Frameshift Mutationen im β -Cateningen gekennzeichnet (Fukushima et al., 2001). Es wurden darüberhinaus auch epigenetische Unterschiede zwischen CIN und MIN Zellen nachgewiesen, z.B. im Methylierungsmuster (Lengauer et al., 1997). Es scheint außerdem, als würden die beiden Formen der genetischen Instabilität sich gegenseitig ausschließen. In aneuploiden Tumoren wurde so gut wie nie Mikrosatelliteninstabilität beobachtet und Tumore mit dem MIN Phänotyp sind auf chromosomaler Ebene stabil und weisen meist einen nahezu diploiden Karyotyp auf (Lengauer et al., 1997).

Um zu untersuchen, in wieweit sich diese Unterschiede im Expressionsmuster der Zelllinien widerspiegeln, wurden in der vorliegenden Doktorarbeit vergleichende Genexpressionsanalysen von 5 CIN-Zelllinien und 5 MIN-Zelllinien durchgeführt. Ein weiterer Aspekt hierbei war, dass die Gründe für chromosomale Instabilität in Tumoren wie bereits erwähnt noch im Verborgenen liegen. Der Auslöser für die chromosomale Instabilität bei kolorektalen Tumoren ist offenbar bei MIN-Zelllinien nicht vorhanden, beziehungsweise führt in diesen Zelllinien nicht zu Aneuploidien. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transkriptom-Vergleichen zwischen 5 CIN und 5 MIN Zelllinien wurden Gene gefunden, die die beiden Klassen eindeutig trennen. Darüberhinaus gaben sie Hinweise auf Gene, die möglicherweise an der Erhaltung der chromosomalen Stabilität in kolorektalen Tumoren beteiligt sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien:

CACO2: DSMZ, Braunschweig, Deutschland

DLD1: Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD, USA

DLD1 hCDC4-/-: Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD, USA

DLD1 hCDC4 +/+: Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD, USA

HCT116 hCDC4-/-: Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD, USA

HCT116 hSecurin-/-: Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD, USA

HCT116 hCDC4+/+: Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD, USA

HCT116 hSecurin+/+: Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD, USA

HT29: LGC Promochem, Wesel am Rhein, Deutschland

LoVo: DSMZ, Braunschweig, Deutschland

RKO1: LGC Promochem, Wesel am Rhein, Deutschland

SW403: LGC Promochem, Wesel am Rhein, Deutschland

SW48: LGC Promochem, Wesel am Rhein, Deutschland

SW480: LGC Promochem, Wesel am Rhein, Deutschland

SW837: LGC Promochem, Wesel am Rhein, Deutschland

2.1.2 Reagenzien

0,8% Natriumcitrat : 8 g Natriumcitrat in 1l H₂O_{dest} lösen

1%-iges Agarosegel: 0,5g Agarose in 50ml 1 x TAE Puffer zum Kochen bringen, 1µl Ethidiumbromid zugeben und aushärten lassen.

1 x PBS (Phosphorous Buffered Saline): 100 ml 10 x PBS ad 1l mit H₂O_{dest}, pH 7,0

1 x SSC (Standard Saline Citrat): 50 ml 20xSSC ad 1l mit H₂O_{dest}, pH 7,0

1 x TAE: 20 ml 50x TAE ad 1l H₂O_{dest}

10 x PBS (Phosphorous Buffered Saline): 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,5 g

Na₂HPO₄*7H₂O, 2,4 g KH₂PO₄, ad 1l mit H₂O_{dest}, pH 7,0

10% Pepsin: 100 mg Pepsin (Sigma) in 1 ml l H₂O_{reinst} lösen, bei -20°C lagern

100 Basenpaar Markeransatz: 8 µl Stocklösung, 8 µl Gelloading Buffer, 64 µl 1x TE-Puffer

10x MOPS Puffer: Merck, Darmstadt, Deutschland

- 10x Nick-Translationspuffer:** 0,5M TrisHCl pH 8,0, 50mM MgCl₂, 0,5mg/ml BSA
- 10x PCR Puffer (für spezifische PCR):** Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
- 10x PCR Puffer:** Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- 10x RNA Ladepuffer:** Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
- 12x MES Stocklösung:** Für ein Volumen von 50 ml: 3.52 g MES free acid monohydrate, 9.7 g MES Natriumsalz
- 1x PBS/0,2% Tween:** 2ml Tween (Merck, Darmstadt, Deutschland) ad 1l in 1x PBS
- 20 x SSC (Standard Saline Citrat):** 88,2 g 3M Na-Citrat, 175,3 g NaCl ad 1l mit H₂O_{dest}, pH 7,0
- 2x Hybridisierungspuffer:** Für ein Volumen von 50 ml: 8.3 ml 12x MES Stocklösung, 17.7 ml 5M NaCl, 4.0 ml, 0.5 M EDTA, 1 ml Triton x-1000, 19.9 ml DEPC behandeltes H₂O_{reinst}
- 2x SSC:** 100 ml 20x SSC ad 1l mit H₂O_{dest}, pH 7,0
- 40% Dextransulfat:** 0.4 g Dextransulfat in 1 ml 4x SSC lösen
- 4x SSC/ 0.2% Tween-20:** 200 ml 20xSSC, 800 ml H₂O_{dest}, 2 ml Tween 20
- 5 x Fragmentierungspuffer:** 40 ml 1 M TRIS-Acetat, 6.4 g Magnesiumacetat 9.8 g Kaliumacetat 140 ml DEPC behandeltes H₂O_{reinst}
- 50 x TAE:** 242 g Tris base, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA ad 1l H₂O_{dest}, pH 8
- 5M Natriumchlorid, nukleasefrei:** Ambion, Cambridgeshire, UK
- Agarose GTQ:** Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- AGC Mix (5mM):** 5 µl 100 mM dCTP 5 µl 100 mM dATP 5 µl 100 mM dGTP 85 µl H₂O_{dest}
- Anti-Digoxigenin-Cy7:** Amersham, Buckinghamshire, UK
- Antifade:** 10 ml p-Phenylendiaminlösung (100 mg p-Phenylendiamin-Dihydrochlorid in 10 ml 1xPBS) pH 8.0, 90 ml Glycerin, bei -20°C lagern
- anti-Human CyclinB1:** Santa Cruz Biotechnologies, USA
- anti-Myc:** Santa Cruz Biotechnologies, USA
- Aphidicolin:** Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
- Avidin-Cy5.5:** Amersham, Buckinghamshire, UK
- B2 Kontroll Oligonukleotid:** Affymetrix, Santa Clara, USA
- Bio-11-CTP:** LOXO GmbH, Dossenheim, Deutschland
- Bio-16-UTP:** LOXO GmbH, Dossenheim, Deutschland
- Biotin-16-dUTP (50 nmol):** Roche, Penzberg, Deutschland
- Bovines Serum Albumin (BSA):** PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
- BSA Lösung, acetyliert (50 mg/ml):** Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Colcemid (10 µg/ml)** GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Cot-1 DNA (500 µg): Roche, Penzberg, Deutschland
CREST Antikörper: Euroimmun, Lübeck, Deutschland
Cy3-dUTP (25 nmol): Amersham, Buckinghamshire, UK
Cy5 dUTP (25 nmol): Amersham, Buckinghamshire, UK
DAPI Lösung (2mg/ml): Serva, Heidelberg, Deutschland
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100mM): Amersham, Buckinghamshire, UK
DEAC-5-dUTP (25 nmol): Perkin Elmer, Boston, MA, USA
Denaturierungslösung: 35 ml Formamid, 15ml 2x SSC pH 7.0
Denaturierendes Formaldehydgel: 0.5 g Agarose + 42,4 ml DEPC Wasser zum Kochen bringen, kurz abkühlen, 2.5 ml Formaldehyd + 5 ml 10x MOPS zugeben Gel gießen und zum Aushärten stehenlassen
DEPC: Roth, Karlsruhe, Deutschland
Digoxigenin-11-dUTP Roche, Penzberg, Deutschland
DNA-Polymerase I (5 U/µl): Boehringer Mannheim, Deutschland
DNase I Stammlösung: 3 mg DNase I (Roche, Penzberg, Deutschland) in 0.5 ml sterilem 0,3M NaCl und 0.5 ml Glycerol lösen, bei -20°C lagern
dNTP's für DOP PCR (5 µM): 5 µl 100 mM dCTP 5 µl 100 mM dATP 5 µl 100 mM dGTP 5 µl 100 mM dTTP 80 µl H₂O_{dest}
Dulbeccos MEM Medium Biochrom, Berlin, Deutschland
E.Z.N.A Tissue Kit II Peqlab, Erlangen, Deutschland
EDTA Dinatrium Salz, 0.5 M Lösung: Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Ethanol 100% zur Analyse: Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol vergällt: Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid: Merck, Darmstadt, Deutschland
Fixativ: 3 Vol Methanol : 1 Vol. Eisessig
Fluorogreen (FITC) (25 nmol): Amersham, Buckinghamshire, UK
Formaldehyd: Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Formamid deionisiert: Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Fötale Kälberserum: Boehringer, Mannheim, Deutschland
Gel Ladepuffer: 1% Bromphenolblau, 1% Xylencyanol, Glycerol (40%)
H₂O_{reinst}: DeltaSelect, Pfullingen, Deutschland
Hering Sperm DNA: Promega, Mannheim, Deutschland
L-15Leibovitz Medium: Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Lipofectamin 2000 reagent: Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
McCoy's 5 A Medium mit Glutamax: Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MES Free Acid Monohydrate: Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland

MES Natriumsalz: Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland

MgCl₂ (50 mM): Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Myc-Plk2 Plasmid: humanes Plk2 mit N-terminalem 6xMyc-Tag in einem pCS2-Vektor, bereitgestellt von Olaf Stemmann, Molekulare Zellbiologie, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland

Natriumacetat (3 M): 8.203 g Natriumacetat mit Eisessigsäure auf pH 6.5 einstellen, mit H₂O_{dest} auf 100 ml auffüllen

Nick-Translationspuffer (10 x): 10 ml 1 M HCl pH 8.0, 1 ml 1 MgCl₂, 100 µl 10% BSA ad 20ml mit H₂O_{dest}

Opti-MEM Medium: Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Penicillin/Streptomycin (10 000 U/10mg/ml): PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

Pepsin: Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol: FLUKA, München, Deutschland

Propanol zur Analyse: Merck, Darmstadt, Deutschland

Proteinase K (10 mg/ml): FLUKA, München, Deutschland

Rabbit anti Human Cy3 Antikörper: Dianova, Hamburg, Deutschland

RiboMax T7 Kit: Promega, Mannheim, Deutschland

RNA Marker (0.24 kb bis 9.5 kb) (1.0 µg/µl): Invitrogen, Karlsruhe, Germany

RNase (10mg/ml): 10 mg RNase I (Roche, Penzberg, Deutschland) in 1 ml sterilem TE-Puffer lösen, bei -20°C lagern

RNase out: Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

RNase, DNasefrei: Roche, Penzberg, Deutschland

RNeasy Kit 250 (enthält: RNeasy Mini Spin Columns, Sammelgefäße (1.5 ml, 2.0 ml), RLT Puffer, RW1 Puffer, RPE Puffer, RNasefreies Wasser): Qiagen

Salmon Testis DNA (500 µg): Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland

Superscript cDNA Synthese Kit: Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Taq-Polymerase (5U/µl): Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

TexasRed-12-dUTP (1mM): Invitrogen, Molecular probes, Karlsruhe, Deutschland

Trizol Reagent 100: Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Trypsin EDTA: PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland

W1 (1%): Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Zentromer-Hybridisierungsmix: 65% Formamid; 0,5% Dextransulfat (63,7µl Formamid, 9,8 µl 5%DS, 9,8µl 20xSSC, 14,7µl H₂O_{reinst})

2.1.3 Primer

hCDC4 (Exon5) left Primer: 5'-TTT GTT AGG ACT GAA GTT ACT GCC-3' MWG
The Genomic Company, Ebersberg, Deutschland

hCDC4 (Exon5) right Primer: 5'-ATT CGG CTC ATC TGA ATG TG-3' MWG The
Genomic Company, Ebersberg, Deutschland

PTTG-R6 (100 μ M): 5'-AAA ATG GAG AAC CAG GCA CC-3' Genzentrum,
München, Deutschland

PTTG-gen01 (100 μ M): 5'-GGT CCC TTG GTC TTT ACA GA-3' Genzentrum,
München, Deutschland

PTTG-gen01(100 μ M): 5' ACC CGT GTG GTT GCT AAG GA 3' Genzentrum,
München, Deutschland

PTTG-R4 (100 μ M): 5' GTG GGC ATC GAA CGT TTT G 3' Genzentrum, München,
Deutschland

Sec P1 left: 5'-GAT GGG CTG AAG CTG GG-3', MWG The Genomic Company,
Ebersberg, Deutschland

Sec P1 right: 5'-TTT TAA GAG TCA AAA GTG CTT AAG TG-3', MWG The
Genomic Company, Ebersberg, Deutschland

Sec P2 left: 5'-AGC CAT GCC ACT ACC AAA AG-3', MWG The Genomic Company,
Ebersberg, Deutschland

Sec P2 right: 5'-TGC TTG CTA ACC TCT ATT TCC C-3', MWG The Genomic
Company, Ebersberg, Deutschland

6 MW Primer (100 μ M): 5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3', Genzentrum,
München, Deutschland

pUC forward Primer (100 μ M): 5'-CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG-3'
Genzentrum, München, Deutschland

pUC reverse Primer (100 μ M): 5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG-3'
Genzentrum, München, Deutschland

p53 (Exon8/9) 5' (100 μ M): 5'-AGG ACC TGA TTT CCT TAC TGC-3' Metabion,
Martinsried, Deutschland

p53 (Exon8/9) 3' (100 μ M): 5'-GAG GTC CCA AGA CTT AGT AC-3' Metabion,
Martinsried, Deutschland

Oligo dT T7 Primer:5'- 5'-GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG
AGG CGG-T24-VN-3' Metabion, Martinsried, Deutschland

2.1.4 siRNA Oligos

Luciferase Oligo: Dharmacon, Lafayette, USA

MAD2 Oligo: Dharmacon, Lafayette, USA

NTF2 Oligo SMART: Dharmacon, Lafayette, USA

Plk1 Oligo: Dharmacon, Lafayette, USA

Plk2 Oligo alt 1: 5'- GGACATGGCTGTGAATCAG-3', Dharmacon, Lafayette, USA

Plk2 Oligo alt 2: 5'- GAGCAGCTGAGCACATCAT-3', Dharmacon, Lafayette, USA

Plk2 Oligo SMART: Dharmacon, Lafayette, USA

2.1.5 Technische Geräte und Labormaterialien

15x15mm Deckgläser : Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland

24x 60mm Deckgläser: Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland

Biofuge pico: Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Eppendorfgefäße Biopur: Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland

Fixogum: Marabu, Tamm, Deutschland

Fluidic station 400: Affymetrix, Santa Clara, USA

Hybridisation Oven: Affymetrix, Santa Clara, USA

Microcon- YM50 Säule: Millipore, Schwalbach, Deutschland

Microzentrifuge Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Mikroskop Leica DMRXA-RF8: Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd,
Cambridge,
UK

Mikroskop: Zeiss Axioplan2; Zeiss, Göttingen, Deutschland

Mikrozentrifuge 22R: Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Multifuge 3L: Heraeus, Hanau, Deutschland

Phase Lock Gel Tubes (light): Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland

Pipettenspitzen FX1000, 0200, 0020, 0010 RNase-frei: Südlabor, Gauting,
Deutschland

Spectrophotometer Biomate 3: ThermoSpectronic, Deutschland

SpeedVac: Vacuubrand GmbH, Wertheim, Deutschland

Thermocycler PTC-225: MJ Research, Waltham, MA, USA

Thermomixer: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien wurden in den unten aufgeführten Medien mit 10% Fötalem Kälberserum (FKS), 100 units/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Zwei- bis dreimal wöchentlich wurden die Zellen auf neue Kulturflaschen aufgeteilt. Hierfür wurde aus einer Kulturflasche mit konfluent gewachsenem Zellrasen das Medium abgenommen, um anschließend die Zellen mit 1 x PBS zu waschen. Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, mit Kompletmedium gelöscht und auf neue Kulturflaschen verteilt.

Zelllinie	Medium
HCT116 hSecurin+/+ HCT116 hSecurin-/- HCT116 hCDC4+/+ HCT116 hCDC4-/- DLD1 hCDC4+/+ DLD1 hCDC4-/- HT29	McCoy's 5A Medium mit Glutamax
DLD1 RKO1 LoVo CaCo2	Dulbecco's MEM Medium
SW837 SW480 SW48 SW403	L-15 Leibovitz Medium

Tab. 2.1 : Verwendete kolorektale Zelllinien und Kulturmedien

2.2.2 Herstellung der Präparate für M-FISH und Interphase-FISH Analysen

Sowohl für die Interphase-, als auch für die M-FISH Analysen wurden die zu untersuchenden Zellsuspensionen auf Objektträgern fixiert. Da die Kulturen meist eine genügende Anzahl an mitotischen Zellen enthielten, wurde für die Verarbeitung keine Zugabe von Colcemid benötigt. Die Herstellung der Präparate erfolgte nach untenstehendem Protokoll.

- Zellen über Nacht in frischem Komplettmedium ca 70% konfluent wachsen lassen.
- Medium abnehmen, die Zellen kurz mit 1 x PBS waschen, mit Trypsin ablösen und, in Medium aufgenommen, in ein Zentrifugengefäß überführen.
- 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren.
- Den Überstand mit einer Vakuumpumpe absaugen, wobei ca 1ml übrig gelassen wird, um das Pellet durch leichtes Vortexen zu resuspendieren.
- Hypotonie: Zugabe von 7ml 0,8% Natriumcitrat, welches zunächst tropfenweise, dann zügig unter Vortexen auf die Zellsuspension gegeben wird. 35-40 min Inkubation bei 37°C.
- Fixierung: Zellsuspension 10 min bei 800 rpm zentrifugieren, den Überstand bis auf 1ml absaugen und das Pellet resuspendieren. Tropfenweise unter Vortexen Fixativ zugeben und die Suspension 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren. Diesen Fixierungsschritt 5-6 Mal wiederholen. Nach der letzten Zentrifugation den Überstand bis auf 3ml absaugen und das Pellet gut resuspendieren.
- Auftropfen: Zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit die Objektträger auf ein feuchtes Tuch legen. Die Suspension auftropfen. Anschließend die Präparate einige Minuten bei 37°C auf einer Heizplatte inkubieren.
- Lagerung: Die Präparate können zunächst 2-7 Tage bei Raumtemperatur aufgehoben und anschließend in 75% Ethanol bei +4°C gelagert werden.

2.2.3 Vorbehandlung der Präparate für M-FISH und Interphase-FISH

Da die aufgetropften Präparate meist große Mengen an Zytoplasma enthielten, welches sich störend auf die Auswertung auswirken kann, wurde vor jeder Hybridisierung ein Pepsinverdau durchgeführt. Die Dauer des Verdaus wurde, je nach Zytoplasmamenge, variiert. Für M-FISH Hybridisierungen wurden die Präparate zusätzlich mit RNase behandelt, um unspezifischen Hintergrund zu reduzieren. Für den Verdau wurden die folgenden Schritte durchgeführt:

- 5 min Inkubation in 2x SSC .
- Für M-FISH: 20 min RNase Verdau (1:200 verdünnt in 2x SSC) bei 37°C in einer feuchten Kammer.
- 2 x 5 min Waschen in 2 x SSC.
- Pepsinverdau: 1 - 5 min Inkubation in 30µg Pepsin/ml 0,01M HCl Lösung.
- 2 x 5 min waschen in 1 x PBS.
- Zur Entwässerung Präparate je 3 min durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) ziehen.
- Präparate lufttrocknen.

2.2.4 Interphase FISH mit chromosomenspezifischen Zentromersonden

Um statistische Aussagen über die chromosomale Stabilität der beschriebenen Zelllinien treffen zu können, wurden Interphase FISH Analysen mit chromosomenspezifischen Zentromersonden durchgeführt. Bei diesen Analysen werden die Sonden auf, wie unter 2.2.2 beschrieben fixierte, Zellkerne hybridisiert. Anschließend werden pro Kern die Signale der jeweiligen Sonde ausgezählt. Bei einem diploiden Zellkern sollte die Anzahl an Signalen für Autosomen demnach 2 betragen.

Die verwendeten Zentromersonden wurden aus MiniPrep-Stocklösungen alphoider Sequenzen hergestellt, die freundlicherweise von Dr. Mariano Rocchi bereitgestellt wurden. (Weitere Informationen: <http://www.biologia.uniba.it/rmc/index.html>). In den folgenden Abschnitten wird beschrieben, wie diese Sequenzen zunächst amplifiziert und anschließend mittels Nicktranslation mit Fluorochromen oder Haptenen markiert wurden. Die Absorptions- und Emissionsmaxima der einzelnen Fluorochrome werden unter 2.2.5.1.3 beschrieben.

2.2.4.1 Amplifikation der Zentromersonden mit Insert-PCR

Die Amplifikation der Zentromersonden erfolgte, wie unten beschrieben, mittels einer Insert PCR. Für diese PCR wurde jeweils 1µl einer 1:10 Verdünnung aus der MiniPrep im folgenden Ansatz eingesetzt.

Stocklösung	Ansatz (µl)	Endkonzentration
10x PCR Puffer	2	1x
MgCl ₂ (15 mM)	0,6	1,5 mM
W1 (1%)	1	0,05 %
dNTPs (5 mM)	1	0,25 mM
pUC fwd Primer (100 µM)	0,4	0,2 µM
pUC rev Primer (100 µM)	0,4	0,2 µM
Taq Polymerase	0,2	0,05 U/µl
H ₂ O _{reinst}	14,4	
DNA (1:10)	2	100 ng

- Die Ansätze werden nach folgendem Insert PCR Programm amplifiziert:

Initiale		95°C, 5 min
	Denaturierung:	95°C, 45 sek
	Annealing	62°C, 1 min 20
35 Zyklen	Elongation	72°C, 1 min 20
Finale Elongation		72°C, 5 min

- Zur Längenkontrolle wird die amplifizierte DNA auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen.

2.2.4.2 Markierung von Zentromersonden mittels Nicktranslation

Die Zentromersonden wurden mittels Nicktranslation mit den jeweiligen Fluorochromen markiert. Bei der Nicktranslation werden in der zu markierenden DNA durch das Enzym DNase I Einzelstrangbrüche („nicks“) gesetzt, von denen aus die DNA- Polymerase I durch ihre 5` - 3` Exonucleaseaktivität Nukleotide abbaut und durch die gleichzeitige Polymeraseaktivität bei der Reparatursynthese markierte Nukleotide in den DNA-Strang einbaut.

Im Folgenden werden die durchgeführten Schritte dieser Markierungsmethode erläutert.

- Pipettierschema Nicktranslation:

	10xNT Puffer (μl)	0.1 M Mercapto- EtOH (μl)	0.5 mM AGC- Mix (μl)	1mM Fluor./ Hapten (μl)	DNA (μl)	Poly- merase (μl)	DNase (1:5000) (μl)
Cen7	5	5	5	2 (Bio)	20	1	8
Cen8	5	5	5	2 (Dig)	20	1	8
Cen11	5	5	5	2 (Cy5)	20	1	8
Cen17	5	5	5	2 (Cy3)	20	1	8
Cen18	5	5	5	2 (Texas Red)	20	1	8

- Ansätze 2 Stunden bei 15°C im Wasserbad inkubieren.
- Proben auf Eis geben (Reaktionsstopp).
- Lagerung der Proben bei -20°C.

2.2.4.3 Herstellung des Zentromersondenmixes

Die Zusammensetzung des Zentromersondenmixes wurde für die jeweiligen Nicktranslationsansätze optimiert. Zusätzlich zu den Sonden wurde jedem Mix Cot1 DNA zugegeben, um unspezifische Hybridisierungen zu unterdrücken.

- Pipettierschema Zentromermix:

Lösung	Ansatz (μl)
Cen 7 Biotin (1:10)	8
Cen8 FITC (1:10)	7
Cen17 Cy3 (1:10)	5
Cen18 Texas Red (1:10)	2
Cen11 Cy5 (1:10)	10
Cot1 DNA	8

- Den Zentromersondenmix gut vermischen und in der SpeedVac vollständig eindampfen.
- Das Sediment in 6,5 μ l Zentromer-Hybridisierungsmix lösen.

2.2.5 7 Fluorochrom Multiplex-FISH (M-FISH)

Die 7 Fluorochrom Multiplex Fluoreszenz in situ Hybridisierung (M-FISH) ist ein Verfahren, mit welchem, durch kombinatorische Markierung, jedes homologe Chromosomenpaar, sowie das X und Y Chromosom in einer anderen Farbe dargestellt werden kann (Speicher et al., 1996; Azofeifa et al., 2000). Die Auflösungsgrenze des 7 Fluorochrom M-FISH liegt bei einer perfekten Hybridisierung bei etwa 2,6 Mb, da die pseudoautosomale Region 1 (PAR1), sowie die XY homologe Region (XY-HR; 4Mb) erkannt werden können, nicht aber die PAR2 (320kb). In der vorliegenden Arbeit wurden 7 Fluorochrom M-FISH Analysen durchgeführt, um den Karyotyp von verschiedenen Zelllinien zu beschreiben, sowie das Ausmaß chromosomaler Gewinne und Verluste in instabilen Zelllinien zu erfassen.

2.2.5.1 Herstellung von Whole Chromosome Painting Probes (WCP) für den 7 Fluorochrom M-FISH

2.2.5.1.1 Vorbereiten der DNA-Pools

Chromosomen wurden mit Durchflussszytometrie sortiert und entsprechend der nachfolgenden Tabelle 2.2 zu DNA Pools zusammengefasst.

DEAC-Pool		FITC-Pool		Cy3-Pool		TexasRed-Pool		Cy5-Pool		Biotin-Pool (Cy5.5)		Digoxigenin-Pool(Cy7)	
Chr.	µl	Chr	µl	Chr	µl	Chr	µl	Chr	µl	Chr	µl	Chr	µl
1	3	1	3	3	2	3	1.6	2	2	2	2.5	5	1
6	1.5	4	2	6	2	4	1.5	12	0.8	7	1.8	8	1
10	0.7	5	1	8	1	9	1	13	2	9	1.2	12	1
13	0.9	7	1	11	1	10	1	15	1	11	1	14	1
16	2.5	18	2	15	1	17	0.8	17	1	14	1	22	1
X	1	19	1.5	18	2	22	1	21	2	16	3	X	1
		21	2	20	1	Y	0.7						

Tab. 2.2: Chromosomenspezifische Paintingsonden

2.2.5.1.2 PCR-Amplifikation der DNA-Pools

Die Amplifikation der DNA wurde mittels einer DOP-PCR (degenerate oligonucleotide-primed PCR; Telenius et al. 1992) durchgeführt. Diese PCR amplifiziert homogen die eingesetzte DNA unter Verwendung eines degenerierten Primers, der ein Binden an den DNA-Strang etwa alle 4 kb zulässt. Jeder DNA Pool wurde in einem 25 µl Reaktionsmix-Ansatz nach untenstehenden Bedingungen für die DOP-PCR eingesetzt.

Zusätzlich wurde bei jeder DOP-PCR eine Negativkontrolle mitgeführt, um auf DNA Kontaminationen zu testen.

- Pipettierschema DOP-PCR:

Stocklösung	Ansatz (µl)	Endkonzentration
10x PCR Puffer	2.5	1x
50 mM MgCl ₂	1	2 mM
5 mM dNTPs	1	0.2 mM
100 µM 6MW	0.5	2 µM
H ₂ O _{reinst}	18.8	
Taq-Polymerase	0.2	1 U
DNA-Pool	1	

- Die Ansätze werden nach untenstehendem PCR Programm (DOP-PCR) amplifiziert:

Initiale		95°C, 5 min
5 Zyklen	Denaturierung:	95°C, 1 min
	Annealing	30°C, 1 min 30
	Ramp 0,2°C/sec auf 72°C	
	Elongation	72°C, 3 min
35 Zyklen	Denaturierung:	94°C, 1 min
	Annealing	62°C, 1 min 30
	Elongation	72°C, 3 min
Finale Elongation		72°C, 5 min

- Zur Längenkontrolle wird die amplifizierte DNA auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen.

2.2.5.1.3 Markierung der DNA Pools mittels Label-DOP-PCR

Durch eine Label-DOP PCR wurden die amplifizierten DNA Pools mit dem jeweiligen Fluorochrom markiert. Auch hier wurde, wie im Folgenden beschrieben, ein Ansatz von 25 µl in die PCR eingesetzt. Bei einer Label-DOP-PCR werden dUTPs in die neu synthetisierten Stränge eingebaut, die an Fluorochrome oder Haptene gekoppelt sind. Unten stehende Tabelle beschreibt die Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome.

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Diethylaminocoumarin (DEAC)	426	480
Fluorescein/ Fluorgreen (FITC)	495	521
Cyanine Farbstoff Cy3	554	568
Cyanine Farbstoff Cy3.5/ (TR)	581	588
Cyanine Farbstoff Cy5	652	672
Cyanine Farbstoff Cy5.5	682	703
Cyanine Farbstoff Cy7	710	805

Tab. 2.3: Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome

- Pipettierschemata Label-DOP-PCR:

Ansatz für DEAC, Texas Red, Biotin- und Cy3:

Stocklösung	Ansatz (µl)	Endkonzentration
10x PCR Puffer	2.5	1x
50 mM MgCl ₂	1	2 mM
5 mM AGC	1	0.2 mM
5 mM dTTP	0.75	0.15 mM
1 mM gekoppelte dUTPs	1.25	0.05 mM
100 µM 6MW	0.5	2 µM
H ₂ O _{reinst}	16.8	
Taq-Polymerase	0.2	1 U
DNA-Pool	1	

Ansatz für Digoxigenin-, FITC und Cy5:

Stocklösung	Ansatz (µl)	Endkonz.
10x PCR Puffer	2.5	1x
50 mM MgCl ₂	1	2 mM
5 mM AGC	1	0.2 mM
5 mM dTTP	0.5	0.1 mM
1 mM gekoppelte dUTPs	2.5	0.1 mM
100 µM 6MW	0.5	2 µM
H ₂ O _{reinst}	15.8	
Taq-Polymerase	0.2	1 U
DNA-Pool	1	

- Die Ansätze werden nach untenstehendem PCR Programm (Label-DOP-PCR) amplifiziert:

Initiale		94°C, 3 min
30 Zyklen	Denaturierung:	94°C, 1 min.
	Annealing	56°C, 1 min
	Elongation	72°C, 4 min
Finale Elongation		72°C, 20 min

2.2.5.1.4 DNase I Verdau

Für auswertbare Hybridisierungsergebnisse ist eine Fragmentlänge von 200 – 800 bp der markierten DNA optimal. Da diese aber nach der Markierung meist größer war, musste, wie unten beschrieben, ein DNase I Verdau durchgeführt werden. Die Menge an DNase I und die Dauer des DNA Verdaus wurden anhand des Gelbildes aus der Label-DOP-PCR bestimmt.

- Pipettierschema für den DNase I Verdau:

Stocklösung	Ansatz (µl)
10x Nicktranslationspuffer	5
DNase (1:1000 in H ₂ O _{reinst})	5
H ₂ O _{reinst}	15

- 10-60 min. Inkubation bei 15°C im Wasserbad.
- Jeweils 1/10 des Volumens auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen, um die Länge der Fragmente zu überprüfen.
- Bei zu langen Fragmenten gegebenenfalls nachverdauen (Zugabe von 5µl neu angesetzter DNase I Verdünnung).

2.2.5.2 Vorbereiten des 7 Fluorochrom M-FISH Hybridisierungsmixes

Zunächst wurde ein Fällungsmix vorbereitet, der zusätzlich zu den 7 verdauten DNA-Pools Cot-1 DNA und Salmon testis-DNA, 1/10 Volumen 3M Natriumacetat und das 2,5-fache Volumen an Ethanol enthält.

Das folgende Protokoll wurde für ein Volumen von 12µl Hybridisierungsmix optimiert.

- Pipettierschema M-FISH Fällungsmix:

DNA-Pool	Volumen (µl)	Cot-1 DNA (µl)	Salmon testis-DNA (µl)	Σ	3M NaOAc (1/10 Vol.) (µl)	100% EtOH (x 2,5 Vol.) (µl)
DEAC-	8	25	2,5	64	6,4	175
FITC-Pool	8					
Cy3-Pool	6					
TR-Pool	2					
Cy5-Pool	4					
DIG-Pool	8					
BIO-Pool	5					

- Fällung bei -20°C über Nacht.
- 30 min Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C.
- Überstand abnehmen, Pellet mit 500 µl 70%-igem Ethanol (-20°C) waschen.
- 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm.
- Pellet lufttrocknen und in 6µl deionisiertem Formamid 42°C auf dem Thermomixer lösen.
- Zugabe von 6 µl 40% Dextransulfat
- Lagerung des M-FISH Hybridisierungsmixes bei -20°C.

2.2.6 Hybridisierung von Zentromer- oder WCP-Sonden auf vorbehandelte Präparate

Für die Hybridisierung müssen sowohl Sonden DNA, als auch die DNA auf dem Präparat einzelsträngig vorliegen. Für eine Denaturierung doppelsträngiger DNA ist normalerweise eine Temperatur von 96°C nötig, jedoch wird, durch Zugabe von Formamid in den Sondenmix und die Denaturierungslösung, die Schmelztemperatur der DNA auf etwa 70°C reduziert.

- 2 min Denaturierung der trockenen Präparate in Denaturierungslösung bei 72°C.
- Präparate durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%), bei -20°C ziehen.
- Präparate lufttrocknen.
- Denaturierung des Sondenmixes: 7 min bei 78°C im Heizblock.
- Nur bei M-FISH Sondenmix: Preannealing 20 min bei 42°C.
- Auftragen des denaturierten Sondenmixes auf ein ausgewähltes Hybridisierungsfeld. Das Feld luftdicht mit Fixogum versiegeln.
- Hybridisierung: Inkubation für 1-2 Nächte bei 37°C.

2.2.7 Post Hybridisierung und Nachweis für M-FISH und Zentromersonden

Nach der Hybridisierung wurden die Präparate gewaschen und die indirekt markierten Sonden mit Antikörpern nachgewiesen. Vor dem Nachweis mit Antikörpern wurden die Präparate mit Bovinem Serum Albumin (BSA) abgeblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu unterdrücken. Während des gesamten Nachweises wurde darauf geachtet, dass die Präparate nicht durch Licht ausbleichen.

- Deckglas und Fixogum entfernen.
- 3x 5 min Waschen in 4xSSC/0,2% Tween (42°C) auf dem Schüttler.
- 3x 5 min Waschen in 1xSSC (60°C) auf dem Schüttler.
- Präparat kurz in 4xSSC/0,2% Tween tauchen.
- 30 min Blocken mit 3% BSA in einer feuchten Kammer bei 37°C.
- Präparat kurz in in 4xSSC/0,2% Tween tauchen.

- 45 min Antikörpernachweis: 37°C in einer feuchten Kammer
Antikörperverdünnungen:

M-FISH

Antikörper	Verdünnung
Avidin-Cy5.5	1:200 in 1% BSA
Anti-Digoxigenin-Cy7	1:50 in 1% BSA

Zentromersonden

Antikörper	Verdünnung
Avidin Cy5.5	1:200 in 1% BSA
Anti-Digoxigenin.FITC	1:200 in 1% BSA

- 3x 5 min Waschen in 4x SSC/0.2% Tween-20, bei 42°C.
- 2 min DAPI Färbung: 1 ml 1:15000 Verdünnung der DAPI Stocklösung auf die Präparate geben.
- Präparate mit H₂O_{dest} abspülen und lufttrocknen lassen.
- Präparate mit Antifade eindecken.

2.2.8 Auswertung

Die Auswertung der der hSecurin -/- und hCDC4-/- Analysen erfolgte sowohl am Zeiss Mikroskop Axioplan 2 als auch am Leica Mikroskop DMRXA-RF8, die beide über, zu den Fluorochromen korrespondierende spezifische Filter (bereitgestellt von der Firma Chroma) verfügten. Als Lichtquelle diente eine 100W Quecksilberdampflampe.

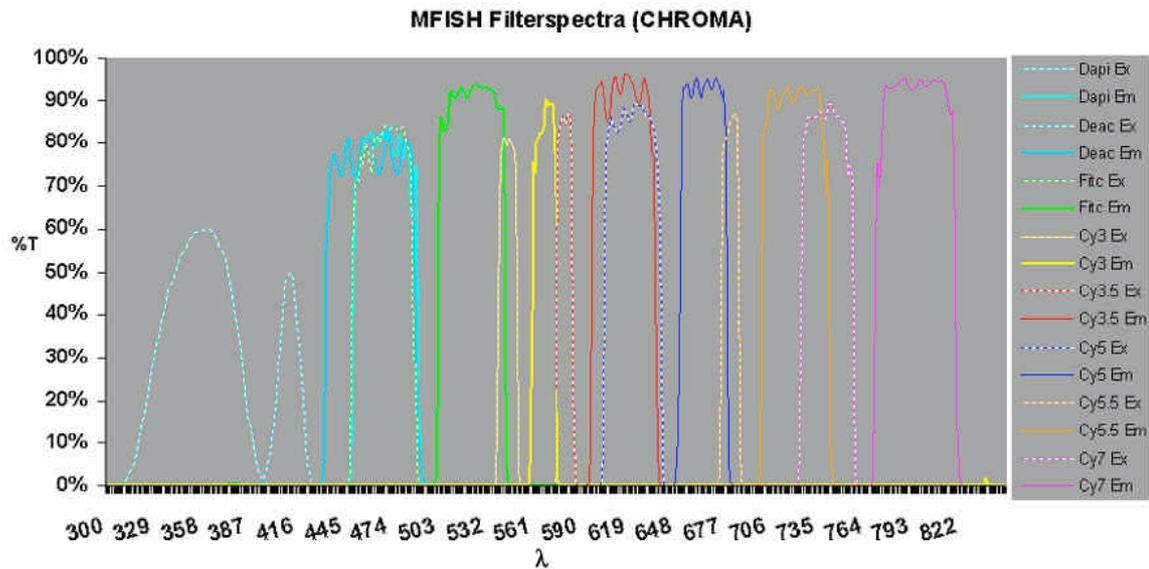


Abb 2.1 Spektren der verwendeten Fluorochromfilter der Firma Chroma. Ex: Excitation (Anregung), Em: Emission, λ: Wellenlänge.

	DAPI	FITC	Cy3	Cy3.5/TR	Cy5	Cy5.5	Cy7
Anregungsfilter	360 ± 20	475 ± 15	546 ± 5,5	580 ± 5	602 ± 19	682 ± 6	740 ± 17,5
Strahlteiler	400	497	557	593	647	697	765
Emissionsfilter	460 ± 20	522 ± 20	567 ± 7,5	612 ± 15	667 ± 15	720 ± 20	790 ± 20

Tab. 2.4: Verwendete Filter

Mittels einer Sensys CCD Kamera (charge coupled device), wurde eine Sequenz von Bildern in den einzelnen Kanälen aufgenommen. Zeiss Axioplan Mikroskop und Kamera wurden über die Software "Metasystems Finder" (Version 1.8.2001) gesteuert. Die Aufnahme einzelner Metaphasen erfolgten sowohl mit der "Isis"-Software von Zeiss, als auch mit der "Leica Q FISH"- Software. Für die Erstellung der Karyogramme in den Klassifizierungsfarben wurden die Programme "Isis" und "Leica MCK" verwendet. "Leica MCK" wurde in einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe iBioS (Leitung: R. Eils, DKFZ, Heidelberg) entwickelt und wird von der Firma Leica vertrieben (Eils et al. 1998).

2.2.9 Spezifische PCR zur Überprüfung des Knockouts

Um zu überprüfen, ob die Zelllinien HCT116 hSecurin^{-/-}, DLD1 hCDC4^{-/-} und HCT116 hCDC4^{-/-} den Knockout tatsächlich aufweisen, wurde zu verschiedenen Passagezahlen eine spezifische PCR mit Primern für die deletierten Regionen durchgeführt.

Die Deletion des Exons 3 bei HCT116 hSecurin^{-/-} Zelllinien wurde in 2 PCR Reaktionen mit Kombinationen aus den 4 original Primern (PTTG1-R1, PTTG1-R4, PTTG1-R6, PTTG1-gen01), die in der Publikation von Jallepalli et al. beschrieben wurden, durchgeführt (Jallepalli et al., 2001). Lediglich DNA der Wildtyp Zelllinie kann mit diesen Primern amplifiziert werden, da einer der beiden Primer in der deletierten Region bindet.

Zusätzlich wurden Primer synthetisiert (Sec P1 left, Sec P1 right, Sec P2 left, Sec P2 right), welche up- und downstream der Deletionsregion binden, wodurch ermöglicht wurde, ein verkürztes Produkt bei hSecurin^{-/-} Zellen zu identifizieren.

Im Kontrollansatz wurden mit den selben Primerpaaren PCR Reaktionen für die jeweiligen Wildtyp Zelllinien durchgeführt. Zusätzlich wurden Primerpaare für Exon 8/9 des Tp53 Gens verwendet.

2.2.9.1 DNA Isolation

Untenstehendes Protokoll beschreibt wie unter Verwendung des E.Z.N.A Tissue Kits, genomische DNA isoliert wurde.

- Die konfluent gewachsenen Zellen mit Trypsin ablösen und in ein Zentrifugenröhrchen überführen.
- 10 min bei 1000 rpm abzentrifugieren.
- Überstand absaugen, das Zellpellet mit PBS waschen und erneut 10 min bei 1000 rpm abzentrifugieren.
- Pellet resuspendieren und in ein 2ml Reaktionsgefäß überführen.
- 5 min bei Raumtemperatur mit 400x g zentrifugieren.
- Überstand abnehmen und Pellet in 400 µl TL Puffer resuspendieren.
- 25 µl OB Protease zugeben und gut vermischen.
- 1 Std Inkubation bei 55 °C auf dem Schüttler.
- RNase Verdau: 2 min mit 20 µl RNase.
- 440 µl BL-Puffer zugeben und das Gemisch 10 min bei 70°C inkubieren.
- 440 µl Ethanol absolut zugeben und das Reaktionsgemisch auf eine Säule transferieren.

- 1 min bei RT und 8000 x g zentrifugieren. Den Durchfluss verwerfen.
- Waschen der DNA: Säule auf ein neues Sammelgefäß stecken und 750 µl DNA Waschpuffer zugeben. 1 min bei RT und 800 x g zentrifugieren.
- Waschschrift wiederholen.
- Trocknen der DNA: 2 min bei RT und maximaler Drehzahl zentrifugieren.
- Säule auf ein neues Reaktionsgefäß transferieren.
- Elution: 200 µl Elutionspuffer auf die Säule pipettieren, 3 min inkubieren.
- 1 min bei RT und 8000 x g zentrifugieren.
- Elutionsschritt wiederholen.

Auf einem 1%-igen Agarosegel wurde die DNA zur Kontrolle aufgetrennt.
Die isolierte DNA konnte bei -20°C eingefroren werden.

2.2.9.2 Spezifische PCR

Für die spezifische PCR wurden folgende Primerkombinationen verwendet:

	Primerkombinationen		
HCT116 hSecurin+/+	PTTGR6 /	Gen01 / PTTGR4	SecP1 left /
HCT116 hSecurin-/-	PTTGR1		SecP2 right
HCT116 hCDC4+/+	CDC4 left / CDC4 right		
HCT116 hCDC4-/-			
DLD1 hCDC4+/+			
DLD1 hCDC4-/-			

Tab. 2.5: Primerkombinationen für die spezifischen PCR Reaktionen zur Überprüfung der hSecurin- und hCDC4 Knockouts

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt.

- Pipettierschema Spezifische PCR (Ansatz für 10 Reaktionen):

Stocklösung	Einsatz in µl	Endkonzentration
10 x PCR Puffer+ dNTPs	10	1 x Puffer + dNTPs
BSA	2,5	2,5 %
H ₂ O _{reinst}	72,5	
Primer 3' (8 µM)	5	0,4 µM
Primer5' (8 µM)	5	0,4 µM
Taq Polymerase (5 U/µl)	1	

- 9,5 µl des Ansatzes mit 1µl der, wie unter 2.2.9.1 beschrieben, isolierten DNA vermischen.
- Die Reaktion erfolgt im Thermocycler nach folgendem Programm. Da die Annealing-Temperaturen für jedes Primerpaar unterschiedlich sind, wird im Folgenden lediglich "Temp" geschrieben.

Initiale		94°C	5 min
35 Zyklen	Denaturierung	94°C	1 min
	Annealing	Temp	30 sek
	Elongation	70°C	1 min
Finale		70°C	6 min

Anschließend wurden die Proben auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen.

2.2.10 Analyse der Schwesterchromatiden Trennung

Um die Trennung der Schwesterchromatiden in der Anaphase zu untersuchen, wurden die Kinetochore mitotischer HCT116 Wildtyp und hSecurin-/- Zellen mit dem Antikörper CREST (calcinosis-Raynaud's phenomenon-esophageal dismobility-sclerodactyly-telangiectasia syndrome of scleroderma) gefärbt. Zusätzlich wurde ein Cyclin B1-Antikörper als Mitosemarker benutzt. Cyclin B1 wird während S- und G2-Phase exprimiert, während der Prophase in den Kern transportiert und kurz vor Beginn der Anaphase degradiert. Durch die Verwendung dieses Markers wurde ermöglicht, defekte Anaphasen durch fehlende Cyclin B1-Färbung von kondensierten Chromosomen in der Prometaphase zu unterscheiden. Die Antikörperfärbung erfolgte nach untenstehendem Protokoll, wobei in jedem Schritt darauf geachtet wurde, dass die Zellen nicht austrocknen.

- Zellen über Nacht ca 60% konfluent auf 24x60 Deckgläsern wachsen lassen.
- 14 Std Inkubation mit Aphidicolin (Endkonzentration 0,15µg/ml in Medium plus 10% FKS).
- 3 x waschen mit 1xPBS.
- 3 x waschen mit frischem Komplettmedium.
- 10 min Fixierung in PBS/ 4%Paraformaldehyd.
- 3 x 5min waschen in PBS/Tween.
- 15 min Permeabilisierung der Zellen in 0,15% TritonX in PBS/Tween.

- Blocken in 4% BSA in PBS/0,2%Tween.
- 45 min Antikörper Inkubation: CREST Antiserum (Verdünnung 1:200).
- 3 x 5 min waschen in PBS/Tween.
- 45 min Inkubation des zweiten Antikörpers.
Rabbit anti Human Cy3 (Verdünnung: 1:200).
- 3 x 5 min Waschen in PBS/0,2%Tween.
- DAPI Färbung (DAPI Lösung 1:15000 in 4xSSC/0,2%Tween).

Die gefärbten Zellen wurden am Leica Mikroskop mit dem Programm „Leica Q-FISH“ aufgenommen. Um sicherzustellen, dass nicht versehentlich ein Chromatid übersehen wurde, wurde jede Anaphase in verschiedenen Fokusebenen angesehen.

2.2.11 Auszählung von Mikronuklei

Da in der Arbeit von Rajagopalan et al. die chromosomale Instabilität, die die beiden Knockout Zelllinien HCT116 hCDC4^{-/-} und DLD1 hCDC4^{-/-} kennzeichnete, durch Auszählung von Mikronuklei erfasst wurde (Rajagopalan et al., 2004), wurde auch in der vorliegenden Arbeit diese Methode angewandt.

Die Zellen (HCT116 Wildtyp, HCT116 hCDC4^{-/-}, DLD1 Wildtyp, DLD1 hCDC4^{-/-}) wurden hierbei wie unter 2.2.10 beschrieben für 48 Std auf Deckgläsern wachsen gelassen. Anschließend wurden sie 10 min mit PBS/4% Paraformaldehyd fixiert, DAPI gefärbt und eingedeckelt. Pro Zelllinie wurden 1000-3000 Kerne gezählt. Die Auszählung erfolgte blind und nach den folgenden Kriterien:

- Als Mikronukleus zählten Strukturen die höchstens 1/3 des Volumens des zugehörigen Kernes aufwiesen und deutlich vom Kern abzugrenzen waren.
- Kerne, die mehr als einen Mikronukleus zeigten, zählten als 1 Fall.
- Kerne, bei denen aufgrund ihrer Größe davon ausgegangen werden konnte, dass sie tri- oder tetraploid waren, wurden aus der Analyse herausgenommen.

2.2.12 Genexpressionsanalysen

Um die Transkriptomprofile verschiedener Zelllinien zu vergleichen, wurden Genexpressionsanalysen mit dem HG U133 A Expressionschip der Firma Affymetrix durchgeführt. Auf diesem Chip sind etwa 30 000 Gene in Form von Oligos repräsentiert. Aus der isolierten Gesamt RNA werden, durch das unten beschriebene Verfahren, Sonden hergestellt, welche anschließend auf den Chip hybridisiert werden. Die hybridisierte cRNA wird in einem automatisierten Verfahren nachgewiesen und die Fluoreszenzintensität der einzelnen Chip Felder, welche mit

einem Scanner gemessen wird, lässt einen direkten Rückschluss auf die Menge an Ausgangs RNA für die einzelnen Gene zu. Mittels der in 2.2.12.9 beschriebenen Algorithmen können signifikante Unterschiede im Genexpressionsmuster von Vergleichsproben ermittelt werden.

In dieser Arbeit wurden Genexpressionsanalysen zum Vergleich verschiedener Zelllinien angewandt. Im Zuge der hSecurin Analysen wurden verschiedene Passagen der Zelllinien HCT116 hSecurin-/- mit verschiedenen Passagen der Wildtyp Zelllinie verglichen. Ein weiterer Vergleich auf Expressionsebene wurde außerdem zwischen 5 Kolorektalzelllinien mit chromosomaler Instabilität (CIN Zelllinien) und 5 Linien mit Mikrosatelliteninstabilität (MIN Zelllinien) gezogen.

2.2.12.1 RNA Isolation

Um möglichst gleiche Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurde die RNA Isolation durchgeführt, sobald die Zellen etwa 24 Std. gewachsen waren. Dies entsprach einer 60 bis 80 prozentigen Konfluenz. Die Isolation erfolgte nach untenstehendem Protokoll.

- Medium abnehmen und die Zellen kurz mit 1x PBS waschen.
- 1 ml Trizol pro 10 cm der Fläche des Flaschenbodens direkt auf die Zellen geben.
- Die Zellen durch intensives Resuspendieren lysieren.
- Jeweils 1 ml des in Trizol gelösten Zelllysats in 2 ml Reaktionsgefäße überführen (In Trizol ist eine Lagerung bis zu ca 1 Jahr bei -80°C möglich).
- 5 min bei Raumtemperatur inkubieren, um eine vollständige Trennung des Nukleoproteinkomplexes zu erreichen.
- 200µl Chloroform pro 1 ml verwendetem Trizol zugeben, das Gemisch 15 sek. kräftig schütteln und bei Raumtemperatur 2 bis 3 min inkubieren.
- Phasentrennung: Die Proben bei 4°C 15 min bei 12 000x g zentrifugieren.
- Die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
- Präzipitation der RNA: mit dem gleichen Volumen Isopropanol 15 min inkubieren.
- 10 min bei 4°C und 12 000x g zentrifugieren.
- Den Überstand abnehmen und das Pellet mit 1ml 75% Ethanol waschen. (Lagerung des Ethanolpellets bis zu 6 Monate bei -80°C möglich)
- 5 min bei 4°C und 12 000 x g zentrifugieren, Überstand abnehmen und trocknen lassen.

- RNA-Pellet in 15- 30 μ l DEPC-behandeltem Wasser lösen (Lagerung der RNA in DEPC-behandeltem Wasser nur Wochen bis wenige Monate möglich).

Um die Menge an RNA in der Lösung zu bestimmen, wurde die optische Dichte bei 260 nm gemessen, und errechnete sich wie folgt:

1OD = 40 ng RNA

$$\text{Menge RNA } (\mu\text{g/ } \mu\text{l}) = \frac{\text{OD 260 Wert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \mu\text{g/ml}}{1000 \text{ ml}}$$

Bei 280 nm wurde der Proteinanteil bestimmt, der möglichst klein ausfallen sollte. Lag das Verhältnis 260/280 unter 1,7 befand sich zuviel Protein im Verhältnis zur RNA in der Lösung.

Um zu überprüfen, ob die RNA in intakter Form vorlag, wurden die Proben auf einen denaturierenden Formaldehydgel aufgetragen, welches die Bildung von RNA Sekundärstrukturen verhindert.

- Probe zusammen pipettieren für 10 min bei 70°C inkubieren und anschließend 2 min auf Eis abkühlen.

5 μ l Formamid

2 μ l Formaldehyd

2 μ l 5x MOPS

1 μ l DEPC-behandeltes Wasser

1 μ l RNA Lösung

- Bei Raumtemperatur 1 μ l 10x RNA Ladepuffer und 1 μ l Ethidiumbromid (1:10) zugeben.

Zur Längenkontrolle wurde ein RNA Marker verwendet, der einen Bereich von 0.24 kb bis 9.5 kb anzeigt.

Intakte RNA ließ auf dem Gelbild folgende Banden erkennen:

- 2 diskrete Banden ribosomaler RNA, bei etwa 5 kb (28S RNA) und 2 kb (18S RNA),
- ein Schmier, bestehend aus mRNA und hnRNA
- eine niedermolekulare Bande zwischen 0.1 und 0.3 kb, bestehend aus tRNA und 5 S RNA.

2.2.12.2 Synthese des cDNA Erststrangs

Es wurde hierbei ein zum Poly-A Schwanz komplementärer Primer verwendet, um ausschließlich mRNA revers zu transkribieren. Das 5' Ende des Primers war ebenfalls festgelegt und enthielt eine Promoterregion, die während der in 2.2.12.4 beschriebenen "In vitro Transkription" von der T7 RNA Polymerase erkannt wird. Die RNA Lösung wurde vor dem Versuch auf eine Konzentration von 5 bis 20µg in 9µl DEPC-behandeltem Wasser eingestellt.

Die Erststrangsynthese erfolgte nach untenstehendem Protokoll, unter Verwendung des Invitrogen Superscript Kits.

- 1 µl des Oligo dT T7 Primers zugeben, das Reaktionsgemisch 10 min bei 70°C inkubieren, auf Eis abkühlen lassen.
- Pipettierschema Reaktionsmix

Lösung	Ansatz (µl)
5x First strand Buffer	4
0.1 M DTT	2
dNTP Mix	1
RNase out	1

- Reaktionsgemisch kurz auf und abpipettieren und für 2 min bei 42°C inkubieren.
- 2 µl Superscript II Reverse Transkriptase zugeben, 1 Std bei 42°C inkubieren.

2.2.12.3 Zweitstrang cDNA Synthese

Durch E. coli-DNA Polymerase wurde, in folgendem Protokoll, der, durch Reverse Transkription entstandene, Erststrang repliziert. Der RNA Strang wurde hierbei durch RNase H entfernt.

- Zur Probe nacheinander zugeben:

Lösung	Ansatz (µl)
DEPC behandeltes H ₂ O	91
5x Second Strand Buffer	30
dNTP Mix (10 mM)	3
E.coli DNA Ligase (10 U/ µl)	1
E.coli DNA Polymerase 1 (10 U/µl)	4
RNase H (2 U/µl)	1

- Das Reaktionsgemisch 2 Std. bei 16°C inkubieren.
- 2 µl T4 DNA Polymerase (5 U/µl) zugeben und für 5 min bei 16°C inkubieren.
- 1.5 µl RNase (DNasefrei) zugeben und das Reaktionsgemisch für 30 min bei 37°C inkubieren.
- 2.5 µl Proteinase K zugeben und erneut 30 min bei 37°C inkubieren.
- Das Reaktionsgemisch mit 144µl DEPC-behandeltem Wasser auf ein Volumen von insgesamt 300µl einstellen.
- Extraktion: 300µl Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol zusammen mit dem Reaktionsgemisch in ein Phase Lock Gel Tube geben, kräftig schütteln und 2 min bei 12 000 x g zentrifugieren.
- Extraktionsschritt zweimal wiederholen.
- 200 µl DEPC -Wasser auf eine Microcon - YM50 Säule geben.
- Auf diese Säule die obere wässrige Phase, welche die cDNA enthält, überführen.
- 8 min bei 9000 x g zentrifugieren und den Durchfluss verwerfen.
- 200 µl DEPC -behandeltes Wasser auf die Säule geben und 8 min bei 9000 x g zentrifugieren und den Durchfluss verwerfen.
- Elution: Den Filter mit der Unterseite nach oben auf ein neues Reaktionsgefäß setzen und 5 min bei 1000 x g zentrifugieren.
- Lagerung der cDNA bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C.

2.2.12.4 Markierung der Proben durch In-vitro Transkription

Um die Proben zu markieren, wurde, durch Zugabe von Biotin-gekoppelten Nukleotiden und einem Transkriptions Enzymmix, eine In vitro Transkription durchgeführt. Hierfür wurde das Promega Ribomax T7 Kit verwendet.

- Die synthetisierte cDNA in der SpeedVac bei 40°C trocknen.
- Zu jeder Probe zugeben:

Lösung	Ansatz (µl)
rATP	1,5
rGTP	1,5
rCTP	1,12
rUTP	1,12
bio-11-CTP	3,75
bio-16-UTP	3,75

- Volumen auf genau 14µl mit DEPC- behandeltem Wasser einstellen, kurz resuspendieren.
- Bei Raumtemperatur nacheinander zugeben:

Lösung	Ansatz (µl)
5x Transkriptionspuffer	4
Enzym Mix	2

- 4 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubieren.

2.2.12.5 cRNA Reinigung

Für die cRNA Reinigung, bei der nicht eingebaute Nukleotide entfernt werden, wurde das RNeasy Kit von Qiagen gemäß des beiliegenden Protokolls verwendet.

- Folgende Reagenzien der Probe nacheinander zugeben und durch Pipettieren vermischen:

Lösung	Ansatz (µl)
DEPC behandeltes Wasser	80
RLT Puffer	350
Ethanol absolut	250

- Das Reaktionsgemisch auf ein RNeasy Säulchen überführen und 15 sek bei 12000 x g zentrifugieren.
- Die Säule erneut mit der durchgeflossenen Probe beladen und zentrifugieren.
- Das Sammelgefäß mit dem Durchfluss verwerfen und durch ein neues ersetzen.
- 2 x 15 sek bei maximaler Drehzahl zentrifugieren, den Durchfluss verwerfen.
- Trocknen der Membran: Proben 2 min bei 12 000 x g zentrifugieren.
- Elution: Die Säule auf ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführen, 30µl DEPC-behandeltes Wasser direkt auf die Membran pipettieren, 1 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- 1 min bei 12 000 x g zentrifugieren.
- Den Elutionsschritt 1x wiederholen.

Zur Berechnung der RNA Menge wurde, wie in 2.2.12.1 beschrieben, die optische Dichte gemessen.

Die RNA Konzentration sollte nach der Reinigung etwa 1 µg /µl betragen.

Zur Längenkontrolle wurden die Proben auf ein denaturierendes Formaldehydgel aufgetragen.

2.2.12.6 Fragmentierung der cRNA

Die Fragmentierung erfolgte nach folgender Anleitung:

- Zugabe des Fragmentierungspuffers zu 15µg cRNA:

Lösung	Ansatz (µl)
DEPC- Wasser	ad 16
Fragmentierungspuffer	4

- 35 min bei 95°C im Thermocycler inkubieren.
- Proben auf Eis abkühlen lassen.

2.2.12.7 Hybridisierung auf dem HG U133 Chip

Die Hybridisierung der cRNA wurde freundlicherweise von Angela Servatius (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Trogerstrasse 4, 81675 München) durchgeführt.

Die folgenden Angaben beschreiben den Ablauf der Hybridisierung.

- Zur cRNA Lösung zugeben:

Lösung	Ansatz (µl)
5 nM Kontroll Oligonukleotid B2	3
100x eukaryotische Hybridisierungskontrolle	3
Hering Sperm DNA	3
Acetylierte BSA Lösung (50mg/ml)	3
2x Hybridisierungspuffer	150
DEPC- Wasser	118

- 200µl der markierten cRNA gemäß des Affymetrix Protokolls auf den Chip aufgetragen, und im Hybridisierungssofen 24 Std. bei 45 °C hybridisieren.

2.2.12.8 Nachweis, Färbung

Nachweis und Färbung der U133 Chips erfolgten ebenfalls im Institut für Medizinische Mikrobiologie und wurden freundlicherweise von Angela Servatius und Renate Siegelmann durchgeführt. Gemäß den Anleitungen des Affymetrix Protokolls wurden in der Fluidic Station folgende Nachweisschritte ausgeführt:

- 1.) Streptavidin
- 2.) Anti- Streptavidin (biotinyliert)
- 3.) SAPE

2.2.12.9 Scannen und Auswertung

Im Institut für Medizinische Mikrobiologie unter Aufsicht von Angela Servatius, Dr. Roland Lang und Dr. Jörg Mages wurden mit dem Gene Array Scanner 2500 unter Verwendung eines Argon-Ionenlasers die Fluoreszenzintensitäten gemessen. Die Expressionswerte wurden mit dem statistischen Algorithmus von Affymetrix, MAS5 berechnet.

(http://www.affymetrix.com/Auth/support/downloads/manuals/data_analysis_fundamentals_manual.pdf).

Alle weiterführenden Analysen wurden in zwei verschiedenen Ansätzen durchgeführt. Einmal wurden nur Expressionswerte mit einem assoziiertem p-Wert kleiner als 0,04 einbezogen und alle anderen Werte wurden als "missing" gewertet, das zweite Mal wurden alle Werte, ungeachtet des p-Wertes untersucht. Die Signifikanz der ermittelten unterschiedlich exprimierten Gene wurde mit den untenstehenden statistischen Programmen getestet.

Für die Auswertung der Expressionsdaten der hSecurin Knockout Analyse wurden folgende Algorithmen verwendet:

- **Support Vector Machine**

Die SVMs werden bei der Klassifizierung von zwei Klassen eingesetzt. SVMs versuchen, in eine große Datenmenge Hyperebenen zu legen, um dadurch die beiden Klassen so gut wie möglich zu trennen (Cristianini & Shawe-Taylor, 2000). Diese Hyperebene wird mit der linearen Funktion $f(\mathbf{x}) = \mathbf{w} * \mathbf{x} + b$ beschrieben.

- **Recursive feature elimination**

Diese Methode basiert auf einer **Support Vector Machine** (SVM) (Guyon et al. 2002). Zunächst wird der Vektor \mathbf{w} mittels aller Variablen berechnet. Die schlechtesten 10% werden aus der Menge herausgenommen und von den verbleibenden Variablen erneut der Vektor \mathbf{w} berechnet. Dieser Schritt wird so oft wiederholt, bis ein Gen übrigbleibt.

Für die Auswertungen der vergleichenden Expressionsanalyse zwischen CIN und MIN Zellen wurden verwendet:

- **Analysis of variance (ANOVA)**

ANOVA ist Abkürzung für **Analysis of Variance** und beschreibt die Vergleichsmöglichkeiten verschiedener Stichproben.

Dieses Programm kalkuliert, mittels der F Verteilung, die Wahrscheinlichkeit, dass verschiedene Bedingungen in jeweils mehreren Versuchen alle die selbe Verteilung zeigen.

- **Li Wong/ dChip**

Der Li/Wong Algorithmus ist ein multiplikatives Modell für Multi-Chip Analysen von Affymetrix Daten.

Um die biologische Relevanz der Auswertung zu überprüfen, wurden verschiedene Datenbanken benutzt. (www.affymetrix.com, www.ensembl.org, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>)

2.2.13 Western Blot zur Quantifizierung von Separase

Um die Menge an Separase in Zellen ohne Securin, sowie in Wildtyp Zellen zu bestimmen, wurden Western Blots mit einem spezifischen Antikörper gegen den N-Terminus von Separase (Sep N) durchgeführt. Die Zellen wurden, wie in 2.2.1 beschrieben, kultiviert und durch Zugabe von 0,2 µg/ml Nocodazol für 14 Stunden synchronisiert. Nocodazol ist ein Toxin, welches die Polymerisation der Spindel-Mikrotubuli verhindert und somit die Zellen vor der Teilungsphase arretiert. Nach dreimaligem Waschen in 1 x PBS wurde das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C für die Westernblot Analyse aufgehoben.

Die Western Blot Analysen wurden im Zuge einer Zusammenarbeit freundlicherweise von Dipl. Biol. Simone Heubes (Institut für Molekulare Zellbiologie, Max Planck Institut für Biochemie, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Deutschland) durchgeführt. Für die Separase Quantifizierung wurden HCT116 Wildtyp und HCT116 hSecurin^{-/-}-Zellen aus jeweils 6 T75 Kulturflaschen (70% konfluent) in 1 ml 20 mM Tris/HCl pH 7.7, 100 mM NaCl, 10 mM NaF, 20 mM β-Glyzerophosphate, 5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X100, 5% Glycerol, 1 µM Microcystin-LR und Complete[®] Protease Inhibitoren (Roche, Penzberg, Deutschland) lysiert. Nach einer Ultrazentrifugation bei 100 000 x g wurden die Überstände im Western Blot mit einem Antikörper gegen den N-Terminus der Separase analysiert. Die Normalisierung erfolgte durch Verwendung eines monoklonalen β-Tubulin Antikörpers.

2.2.14 Separase Aktivitätsanalyse

In normalen Zellen schneidet aktivierte Separase ihr Substrat, die Cohesin Untereinheit SCC1, in zwei Fragmente, welche im Western Blot nachgewiesen werden können.

Securin Knockout Zellen wurden, ebenso wie Wildtyp Zellen, mit dieser Methode auf ihre Separase Aktivität hin untersucht. Hierfür wurden Zellen aus 4 T75 Kulturflaschen HCT116 Wildtyp und aus 12 T75 Kulturflaschen HCT116 hSecurin^{-/-} wie in 2.2.13 beschrieben lysiert. Separase wurde unter Verwendung eines polyklonalen Rabbit Antikörpers gegen die Sequenz GSDGEDSASGGKTPA von humaner Separase immunopräzipitiert. Für jede Immunopräzipitation wurden 8µg Antikörper an 30µl Protein G Sepharose 4 Fast Flow gekoppelt. Die Separase Aktivierung in Xenopus Extrakt, sowie der SCC1 Cleavage assay wurde wie

beschrieben durchgeführt (Stemmann et al., 2001), wobei allerdings die SCC1 Cleavage Reaktion in Anwesenheit von 1,3 µg/µl antigenischem Peptid erfolgte. Die Separasemengen wurden vor und nach Inkubation im Extrakt durch Immunoblotting der Aliquots analysiert.

2.2.15 siRNA Analysen

In der vorliegenden Arbeit wurden siRNA Analysen angewandt, um die Auswirkungen eines Knockdowns des Plk2 Gens auf die chromosomale Stabilität verschiedener Zelllinien zu untersuchen. Das System wurde zunächst auf seine Effektivität hin getestet, indem ein Plk1 siRNA Oligo transfiziert wurde. Von einem Plk1 Knockdown ist bekannt, dass Zellen in der Prometaphase arretieren und anschließend absterben. Diese arretierten Zellen können sofort nach dem Auftropfen, wie unter 2.2.2 beschrieben, unter dem Mikroskop identifiziert werden. Als Positivkontrolle diente zusätzlich ein MAD2 siRNA Oligo, mit welchem, bei effektivem Knockdown, massive Chromatidensegregationsdefekte beobachtet werden können. Ein siRNA Oligo für das Gen für „Luciferase“, welches in humanen Zellen nicht exprimiert wird, wurde als Negativkontrolle verwendet. Alle Transfektionen wurden gemäß dem folgenden Protokoll durchgeführt.

- Zellen in Medium ohne Antibiotika ca 60% konfluent wachsen lassen
- siRNA Oligos (20 µM) in Opti MEM Medium verdünnen:

Kulturgefäß	Kulturmedium (ml)	Opti -Mem (µl)	siRNA Oligo (µl)
6-well	2	250	5
T25 Kulturflasche	4	500	10

- Lipofectamine reagent in RNase-freiem Sammelgefäß in Opti-MEM Medium verdünnen:

Kulturgefäß	Kulturmedium (ml)	Opti -Mem (µl)	Lipofectamin reagent (µl)
6-well	2	250	5
T25 Kulturflasche	4	500	10

- 5 min Inkubation bei Raumtemperatur.
- Lipofectaminverdünnung und siRNA Oligoverdünnung zusammen geben und durch Auf- und Abpipettieren gut vermischen.
- Komplexbildung: 20-25 min Inkubation bei Raumtemperatur.
- Gemisch auf die Zellen geben und die Zellen bei 37°C im Brutschrank wachsen lassen.

Die transfizierten Zellen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden wie unter 2.2.4 beschrieben mit Interphase-FISH analysiert.

2.2.15.1 Überprüfung der Effizienz des Plk2 Knockdowns

Zur Überprüfung der Effizienz des Plk2 Knockdowns wurden HCT116 Wildtyp und HCT116 hSecurin-/- Zelllinien zusätzlich zur Transfektion des siRNA Oligos mit einem Myc-Plk2 Plasmid transfiziert. In den Plasmid-transfizierten Zellen wurde RNA für ein Myc-Plk2 Fusionsprotein exprimiert, welche jedoch in Zellen mit effizientem siRNA Knockdown größtenteils sofort wieder degradiert wurde. Als Kontrolle dienten Zellen, die lediglich mit dem Myc-Plk2 Plasmid transfiziert wurden. Das Myc-Plk2 Fusionsprotein konnte anschließend durch einen Western Blot mit einem Myc Antikörper nachgewiesen werden.

2.2.15.1.1 Myc -Plk2 Plasmid Transfektion

- Zellen in Medium ohne Antibiotika ca 60% konfluent wachsen lassen.
- Myc-Plk2 Plasmid (1,8 µg/µl) und gegebenenfalls siRNA Oligos (20 µM) zusammen in RNasefreien Sammelgefäßen in Opti MEM Medium verdünnen:

	Kulturgefäß	Kulturmedium (ml)	Opti - Mem (µl)	siRNA Plk2 Oligo(µl)	Myc-Plk2 Plasmid (µl)
Knockdown Ansatz	6-well	2	250	5	1
	T25 Kulturflasche	4	500	10	2
Kontroll Ansatz	6- well	2	250	-	1
	T25 Kulturflasche	4	500	-	2

- Lipofectamin reagent in RNasefreiem Sammelgefäß in Opti-MEM Medium verdünnen:

Kulturgefäß	Kulturmedium (ml)	Opti-Mem (μ l)	Lipofectamin reagent (μ l)
6-well	2	250	5
T25 Kulturflasche	4	500	10

- 5 min Inkubation bei Raumtemperatur.
- Lipofectamin-Verdünnung und Oligo-Verdünnung zusammenführen und durch Auf- und Abpipettieren gut miteinander vermischen.
- Komplexbildung: 20-25 min Inkubation bei Raumtemperatur.
- Gemisch auf die Zellen geben und die Zellen bei 37°C im Brutschrank wachsen lassen.
- Die Zellen nach 24 Std. mit Trypsin ablösen und zentrifugieren.
- Das Zellpellet 2 x mit 1 x PBS waschen und in flüssigem Stickstoff schockfrieren.

In flüssigem Stickstoff konnte das Zellpellet für die Western Blot Analysen aufgehoben werden.

2.2.15.1.2 Western Blot zum Nachweis des Myc-Plk2 Fusionsproteins

Der Western Blot zum Nachweis des Myc-Plk2 Fusionsproteins wurde freundlicherweise von Dipl. Biol. Simone Heubes (Institut für Molekulare Zellbiologie, Max Planck Institut für Biochemie, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Deutschland) durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen, genau wie unter 2.2.13 beschrieben lysiert und nach einer Ultrazentrifugation bei 100 000x g wurden die Überstände im Western Blot mit einem Myc-Antikörper analysiert. Die Normalisierung erfolgte durch Verwendung eines monoklonalen β -Tubulin Antikörpers.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse von Securin Knockout-Zellen

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der vergleichenden Analysen von HCT116 Wildtyp und HCT116 hSecurin^{-/-} beschrieben.

Um die Auswirkungen eines Knockouts in dem Zellzyklus-regulierenden Gen Securin zu untersuchen, wurden zunächst vergleichende M-FISH Analysen von HCT116 hSecurin^{+/+} und HCT116 hSecurin^{-/-} Zellen durchgeführt. Mit diesen Experimenten konnte der Chromosomenstatus der beiden Zelllinien zum Zeitpunkt der Mitose erfasst werden. Um eine möglichst aussagekräftige Statistik über das Ausmaß der chromosomalen Instabilität der Zelllinien zu erstellen, wurden zusätzlich Interphase Analysen mit chromosomenspezifischen Zentromersonden durchgeführt. Anschließende immunhistochemische Experimente ermöglichten es, das Teilungsverhalten der beiden Zelllinien während der Anaphase genauer zu untersuchen. In regelmäßigen Abständen wurde mittels spezifischen PCR Reaktionen mit Primern für Exon 3 des Securingens, auf Anwesenheit des Knockouts getestet, um eine mögliche Vermischung der beiden Zelllinien auszuschließen. Zusätzlich zu diesen deskriptiven Verfahren wurden die Zellen mittels Western Blot Analysen auf ihre Separaselevel und -aktivität hin getestet. Um die Auswirkungen des Securin-Knockouts auf das Transkriptom der Zellen zu untersuchen, wurden darüberhinaus vergleichende Genexpressionsanalysen durchgeführt. Die Ergebnisse der beschriebenen Methoden werden im Folgenden beschrieben.

3.1.1 7 Fluorochrom M-FISH Analysen

Die Zelllinie HCT116 hSecurin^{-/-} wurde in 2 unabhängigen Ansätzen mit 7 Fluorochrom M-FISH analysiert. Im ersten Ansatz wurden Passagen 2, 3, 8 und 12, im Wiederholungsexperiment Passagen 3, 5, 7, 9 und 16 ausgewertet.

Als Kontrolle wurden 4 Passagen der Wildtyp-Zelllinie analysiert (Passagen 1, 3, 4 und 12). Die Hybridisierungen waren stets gut auswertbar. Abbildungen 3.1 und 3.2 zeigen exemplarisch 4 Karyogramme verschiedener Passagen der Knockout-Zelllinie in den Klassifizierungsfarben. In Passage 2 des ersten Experiments zeigten noch 47% der ausgewerteten Metaphasen Verluste (Tab. 3.1), in Passage 3 waren sogar

65 % der Metaphasen aneuploid (Tab. 3.2). Passage 8 zeigte jedoch bereits einen deutlichen Rückgang der chromosomalen Instabilität (Tab. 3.3). Es wurden lediglich in 15% der Metaphasen Chromosomenverluste oder Gewinne gefunden.

Keine der analysierten Metaphasen von Passage 12 zeigte chromosomale Verluste und in nur einer Metaphase wurde der Gewinn eines einzelnen Chromosoms beobachtet (Tab. 3.4).

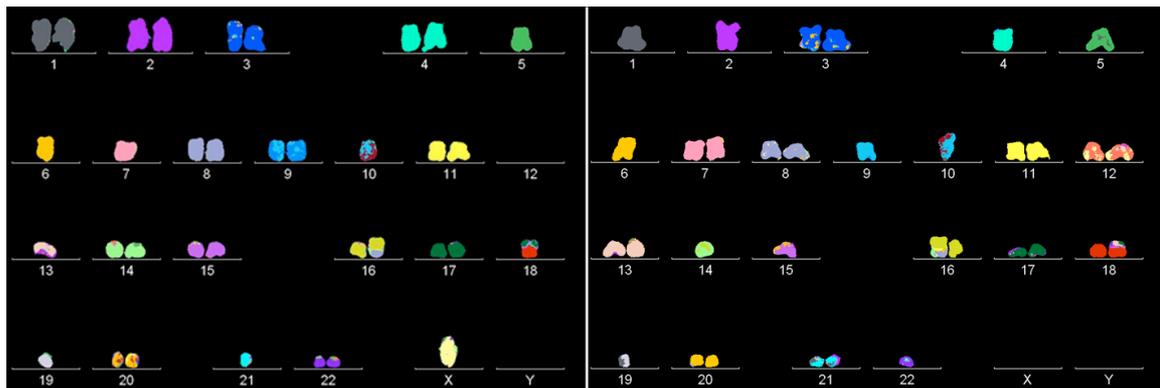


Abb. 3.1 Karyogramme von chromosomal instabilen HCT116 hSecurin^{-/-} Zellen aus Passage 2 in den Klassifizierungsfarben.

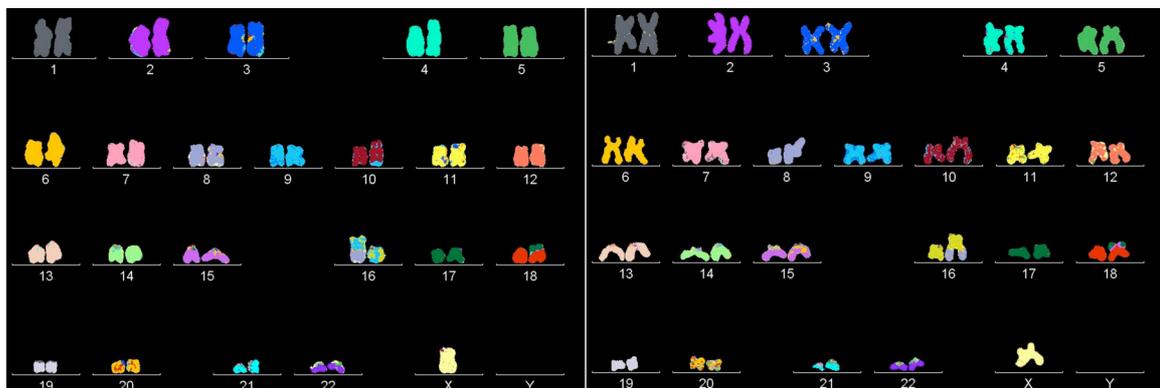
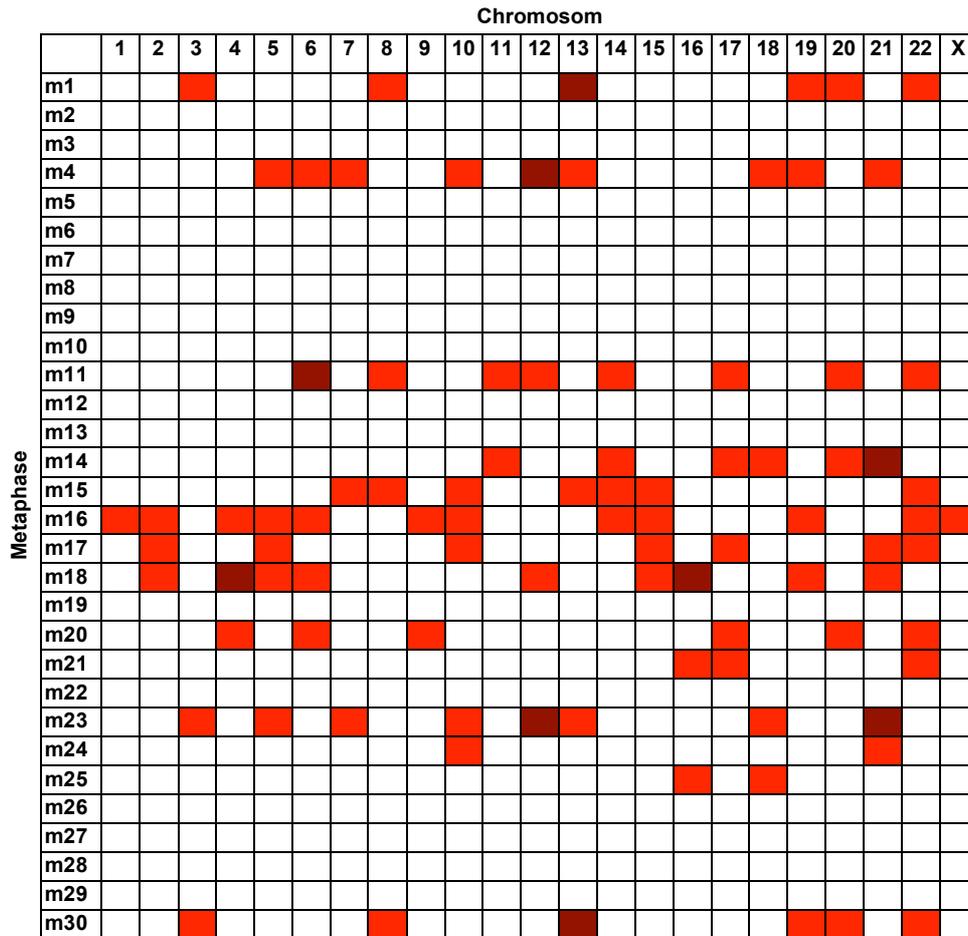
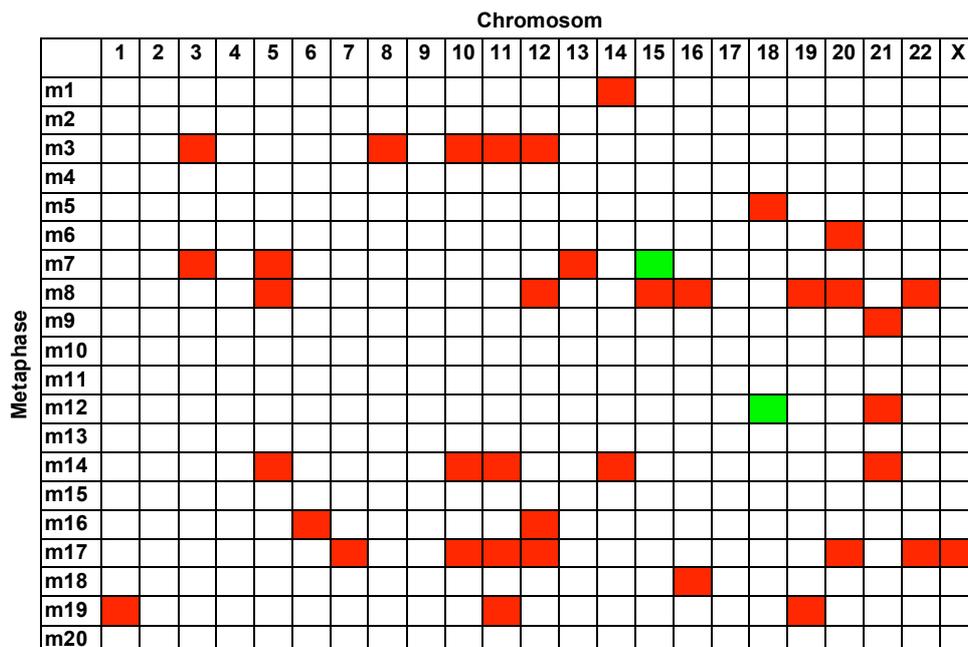


Abb. 3.2: Karyogramme von chromosomal stabilen HCT116 hSecurin^{-/-} Zellen aus Passagen 8 (links) und 12 (rechts) in den Klassifizierungsfarben.



Tab. 3.1: Grafische Zusammenfassung der M-FISH Analyse von HCT116 hSecurin-/- Passage 2. Der Verlust eines Chromosoms wird rot dargestellt, der Verlust beider homologen Chromosomen braun.



Tab. 3.2: Grafische Zusammenfassung der M-FISH Analyse für HCT116 hSecurin-/- Passage 3. Der Verlust eines Chromosoms wird rot dargestellt, der Gewinn eines Chromosoms grün.

		Chromosom																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X		
Metaphase	m1																									
	m2																									
	m3																									
	m4																									
	m5																									
	m6																									
	m7																									
	m8																									
	m9																									
	m10																									
	m11																									
	m12																									
	m13																									
	m14																									
	m15																									
	m16																									
	m17																									
	m18																									
	m19																									
	m20																									

Tab. 3.3: Grafische Zusammenfassung der M-FISH Analyse für HCT116 hSecurin-/- Passage 8. Der Verlust eines Chromosoms wird rot dargestellt, der Verlust beider homologen Chromosomen braun und der Gewinn eines Chromosoms grün.

		Chromosom																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X		
Metaphase	m1																									
	m2																									
	m3																									
	m4																									
	m5																									
	m6																									
	m7																									
	m8																									
	m9																									
	m10																									
	m11																									
	m12																									
	m13																									
	m14																									
	m15																									
	m16																									
	m17																									
	m18																									
	m19																									
	m20																									

Tab. 3.4: Grafische Zusammenfassung der M-FISH Analyse für HCT116 hSecurin-/- Passage 12. Der Gewinn eines Chromosoms wird grün dargestellt.

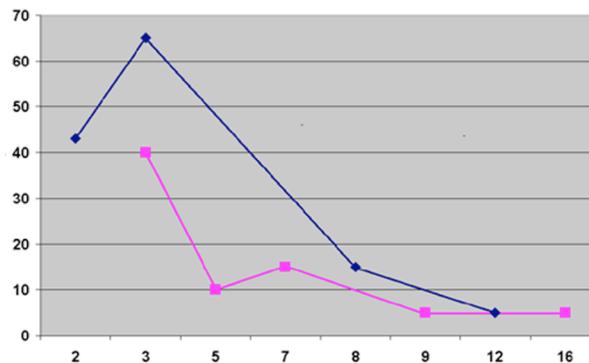


Abb. 3.3: Grafische Darstellung der Abnahme der chromosomalen Instabilität bei HCT116 hSecurin -/- Zellen des ersten Versuches (blaue Linie) und des Wiederholungsversuches (violette Linie). Die x-Achse zeigt die Passagenzahl, die y-Achse beschreibt den Prozentsatz aneuploider Zellen.

Um auszuschließen, dass es sich bei den vorausgegangenen M-FISH Analysen um Artefakte handelte, wurde der Versuch wiederholt. Jeweils 20 Metaphasen der Passagen 3, 5, 7, 9 und 16 wurden in diesem Ansatz analysiert.

Auch im zweiten Experiment zeigte sich der drastische Rückgang der Aneuploidienrate mit steigender Passagezahl (Abb. 3.3).

Während in Passage 3 noch 40% der Metaphasen Aneuploidien aufwiesen, waren es in Passage 5 bereits nur noch 10% und in Passage 7 15%. In Passage 9 wurde lediglich eine aneuploide Metaphase mit zwei zusätzlichen Chromosomen gefunden. Dies entsprach einem Prozentsatz von 5.

In den M-FISH Analysen fiel auf, dass in den früheren Passagen der Knockout Zelllinie (vor Passage 8) hauptsächlich chromosomale Verluste beobachtet wurden, wohingegen ein Gewinn nur sehr vereinzelt vorkam. Der Karyotyp der chromosomal stabilen Passagen der Knockout Zelllinie entsprach genau dem der parentalen Zelllinie. Es wurden keine zusätzlichen strukturellen Aberrationen beobachtet und alle Translokationen der Wildtyp Linie waren auch in Knockoutzellen vorhanden. Als Kontrolle wurden 4 Passagen (1, 3, 4, 12) der parentalen Zelllinie HCT116 untersucht. Der Karyotyp dieser Wildtyp Zelllinie blieb in allen Analysen stabil.

3.1.2 Interphase FISH Analysen mit chromosomenspezifischen Zentromersonden

Durch Interphase FISH Experimente wurden insgesamt 300 Kerne der hSecurin Knockout Zelllinie und 300 Kerne der parentalen Linie in jeweils 3 Ansätzen à 100 Kernen pro Passage ausgezählt. Die Analysen wurden zu einem Zeitpunkt durchgeführt, zu dem die hSecurin-/- Zellen bereits keine durch M-FISH nachweisbare Instabilität mehr aufwiesen (Passage 12 und höher). Verwendet wurden hierfür chromosomenspezifische Sonden für Zentromer 7 (Cen7 Biotin),

Zentromer 8 (Cen8 FITC), Zentromer 17 (Cen17 Cy3) und Zentromer 11 (Cen11 Cy5). Zellen, in denen in 3 oder mehr Kanälen die Anzahl der Signale größer oder gleich 3 war, wurden als tri- bzw. tetraploide Kerne behandelt und aus der Analyse herausgenommen. Wie exemplarisch in Abbildungen 3.4 und 3.5 dargestellt, konnten stets gut auswertbare Hybridisierungsergebnisse erzielt werden.

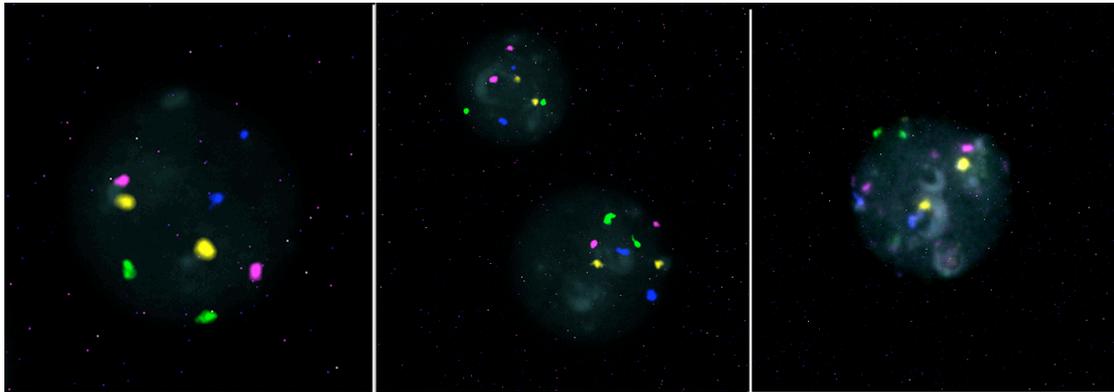


Abb. 3.4: Die Abbildung zeigt 3 Interphase FISH Bilder der Knockout Zelllinie HCT116 hSecurin-/- (aufgenommen mit einer 63-er Vergrößerung). Die Kerne sind mit DAPI gegengefärbt. Die Signale der Hybridisierung eines 4 Farben Sondensets bestehend aus Zentromersonden für Chromosom 7 (Cy5.5, violett) 8 (FITC, grün), 17 (Cy3, gelb) und 11 (Cy5, blau) sind deutlich zu erkennen. Es sind in jedem der Kerne jeweils 2 Signale pro Zentromersonde vorhanden.

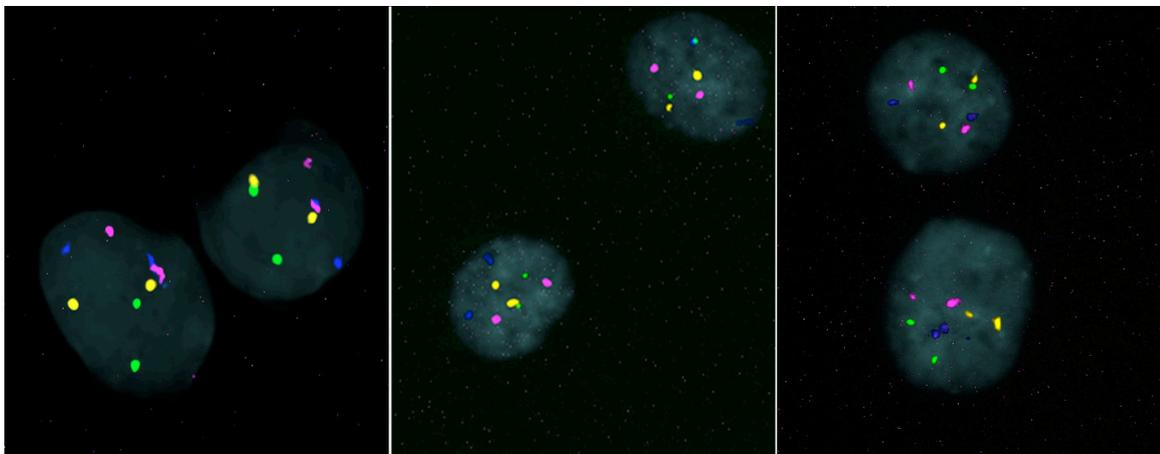


Abb. 3.5: Die Abbildung zeigt Interphase FISH Bilder der Wildtyp Zelllinie HCT116 (aufgenommen mit einer 63-er Vergrößerung). Die DNA ist mit DAPI gegengefärbt. Die Signale der Hybridisierung eines 4 Farben Sondensets bestehend aus Zentromersonden für Chromosom 7 (Cy5.5, violett) 8 (FITC, grün), 17 (Cy3, gelb) und 11 (Cy5, blau) sind deutlich zu erkennen. Es sind in jedem Kern jeweils 2 Signale pro Zentromersonde vorhanden.

Die Balkendiagramme in Abb. 3.6, 3.7 und 3.8 machen deutlich, dass die untersuchten Passagen der Knockout Zelllinie auch in einem großen Ansatz mit den genannten zentromerspezifischen Sonden keine erhöhte Aneuploidienrate im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Die Prozentzahl an Kernen mit 2 Signalen für Chromosomen 7, 8, 11 und 17 in der Knockout Linie war in jedem Experiment vergleichbar mit der der Wildtyp Zelllinie (Abb. 3.9).

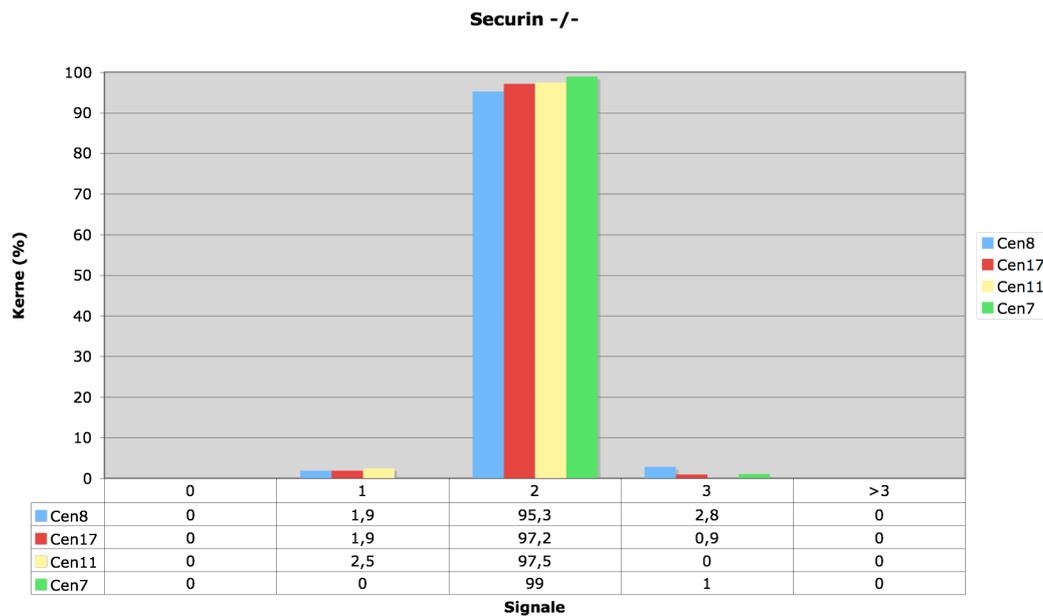


Abb. 3.6: Das Diagramm zeigt zusammengefasst die Daten von 100 ausgezählten Kernen aus Passage 12 der Zelllinie HCT116 hSecurin-/-.

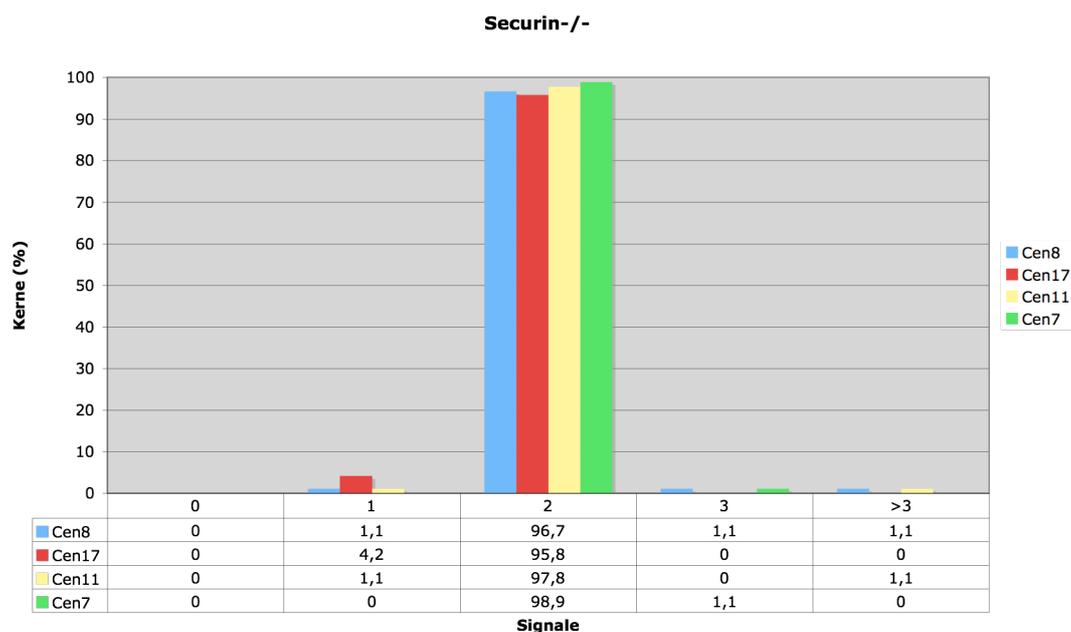


Abb. 3.7: Das Diagramm zeigt zusammengefasst die Daten von 100 ausgezählten Kernen aus Passage 16 der Zelllinie HCT116 hSecurin-/- .

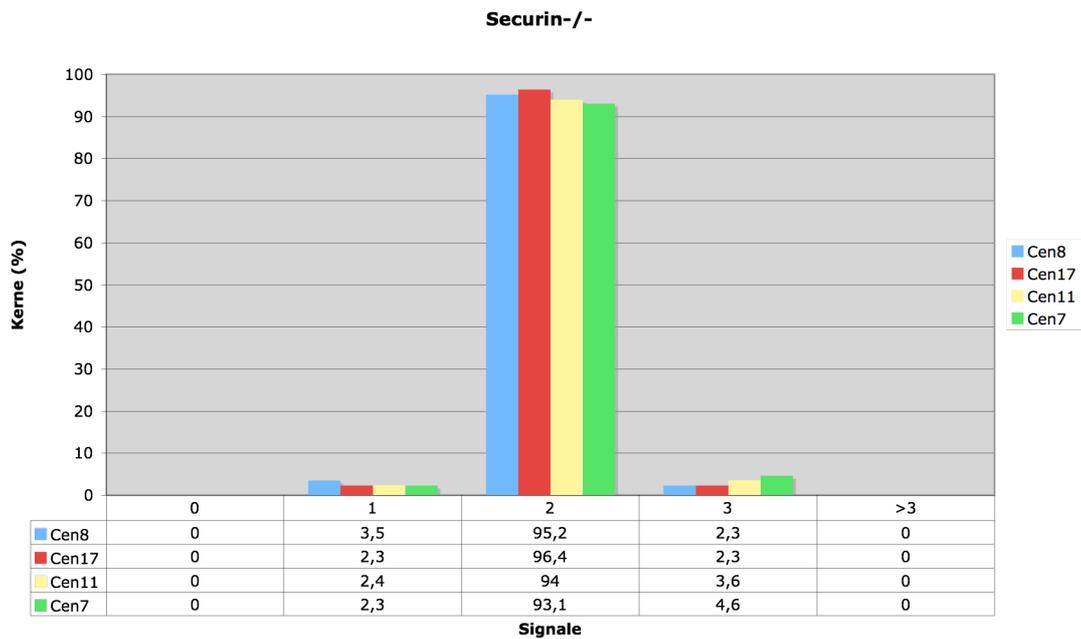


Abb. 3.8: Das Diagramm zeigt zusammengefasst die Daten von 100 ausgezählten Kernen aus Passage 20 der Zelllinie HCT116 hSecurin-/- .

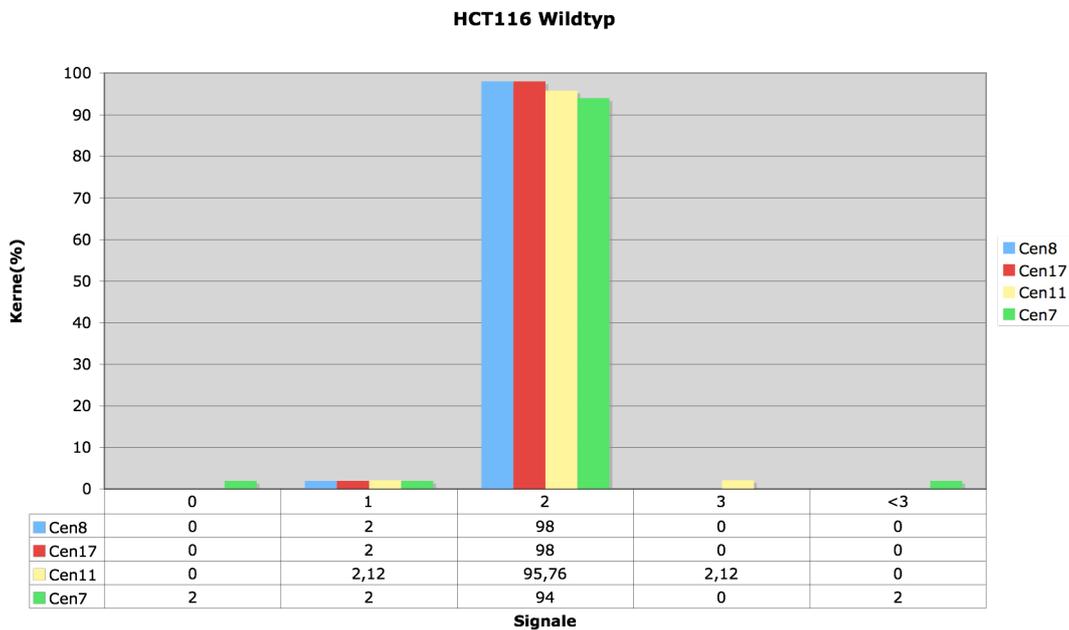


Abb. 3.9: Das Diagramm zeigt zusammengefasst die Daten von 100 ausgezählten Kernen aus Passage 12 der Zelllinie HCT116 Wildtyp .

3.1.3 Analyse der Schwesterchromatidentrennung

Um das Teilungsverhalten der hSecurin^{-/-} Zellen im Vergleich zum Wildtyp zu untersuchen, wurden von jeder Zelllinie insgesamt 75 Anaphasen aus jeweils 3 Passagen analysiert. Da die Kinetochore durch die CREST Färbung (Cy3) sehr gut erkennbar waren, konnten fehlverteilte Chromatiden leicht durch visuelle Inspektion identifiziert werden. Es konnte darüberhinaus durch Verwendung eines Cyclin B1 Antikörpers (anti-Cyclin B1-FITC) ausgeschlossen werden, dass defekte Anaphasen versehentlich mit kondensierten prometaphasischen Chromosomen verwechselt wurden. Abbildungen 3.10 bis 3.13 zeigen exemplarisch einige Wildtyp- und Knockout-Zellen in Ana- und Telophasen

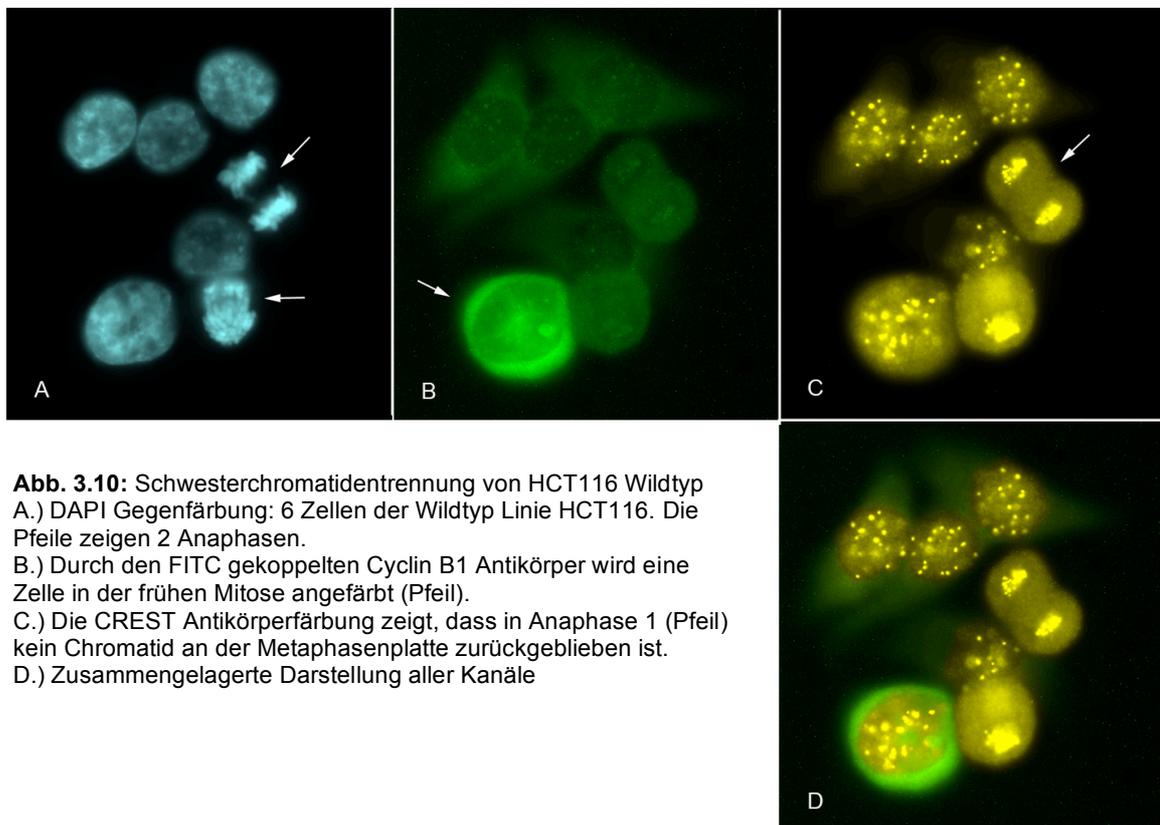


Abb. 3.10: Schwesterchromatidentrennung von HCT116 Wildtyp
 A.) DAPI Gegenfärbung: 6 Zellen der Wildtyp Linie HCT116. Die Pfeile zeigen 2 Anaphasen.
 B.) Durch den FITC gekoppelten Cyclin B1 Antikörper wird eine Zelle in der frühen Mitose angefärbt (Pfeil).
 C.) Die CREST Antikörperfärbung zeigt, dass in Anaphase 1 (Pfeil) kein Chromatid an der Metaphasenplatte zurückgeblieben ist.
 D.) Zusammengelagerte Darstellung aller Kanäle

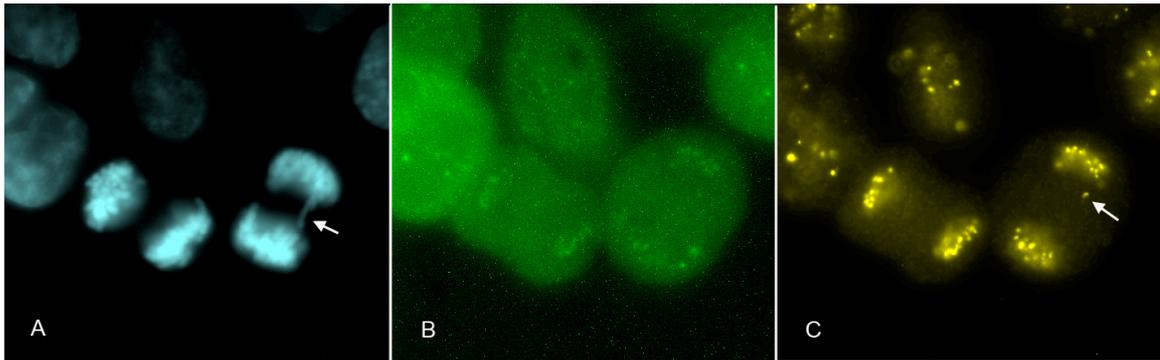


Abb. 3.11:

Schwesterchromatidentrennung von HCT116 Wildtyp

A.) 2 Anaphasen der Zelllinie HCT116 in der DAPI Gegenfärbung. In Anaphase 1 (Pfeil) wird ein Chromatid sichtbar, welches noch nicht zu den Polen gezogen wurde.

B.) Cyclin B1 Antikörperfärbung.

C.) CREST Antikörperfärbung: Das Zentromer des zurückgebliebenen Chromatids ist deutlich zu erkennen (Pfeil).

D.) Zusammengelagerte Darstellung aller Kanäle

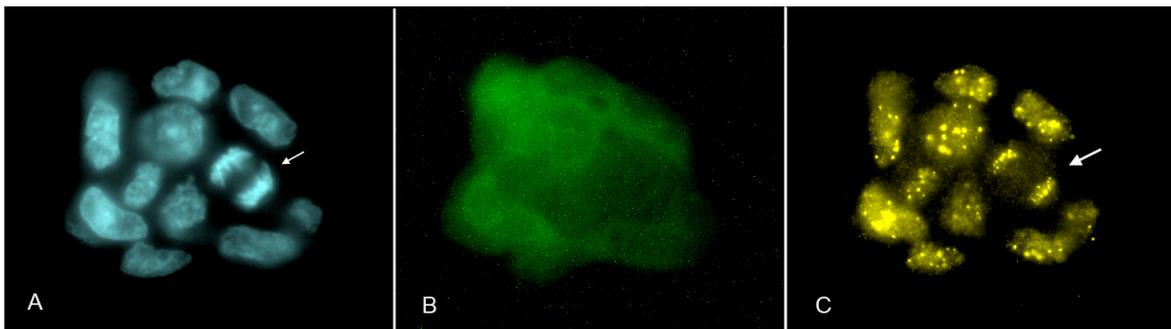
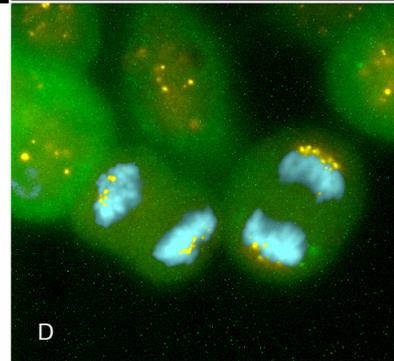


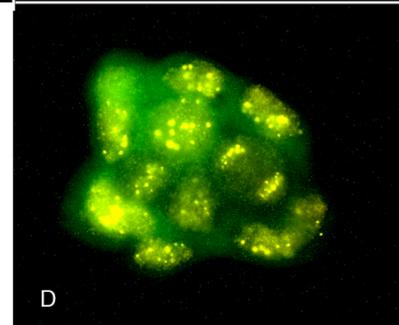
Abb. 3.12: Chromatidensegregation von HCT116 hSecurin^{-/-} Zellen

A.) DAPI Gegenfärbung zeigt einen Zellverband mit einer Anaphase (Pfeil).

B.) Cyclin B1 Antikörperfärbung.

C.) Die CREST Antikörperfärbung zeigt, dass keine Chromatiden an der Metaphasenplatte zurückgeblieben sind.

D.) Zusammengelagerte Darstellung aller Kanäle.



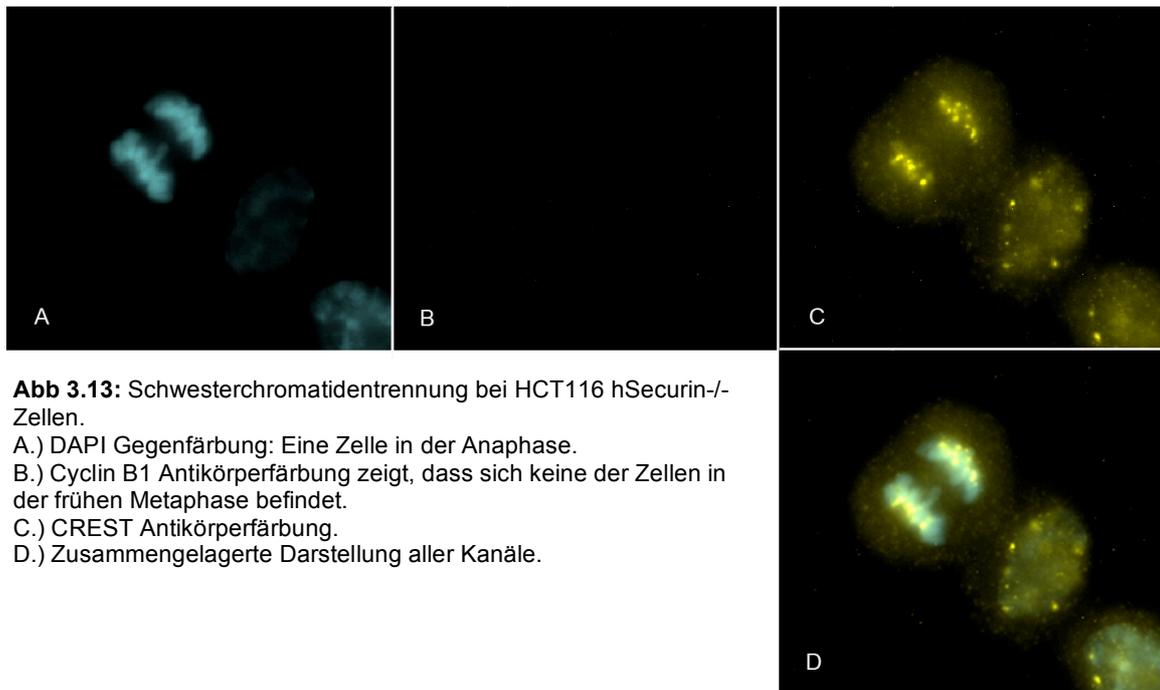


Abb 3.13: Schwesterchromatidentrennung bei HCT116 hSecurin^{-/-}-Zellen.

- A.) DAPI Gegenfärbung: Eine Zelle in der Anaphase.
 B.) Cyclin B1 Antikörperfärbung zeigt, dass sich keine der Zellen in der frühen Metaphase befindet.
 C.) CREST Antikörperfärbung.
 D.) Zusammengelagerte Darstellung aller Kanäle.

Wie in Abb. 3.14 dargestellt, wurden lediglich in 5 % der Ana- bzw Telophasen der Knockout Zelllinie einzelne an der Metaphasenplatte zurückgebliebene Chromatiden gefunden. Die Prozentzahl an defekten Anaphasen waren jedoch vergleichbar mit der des Wildtyps (7%).

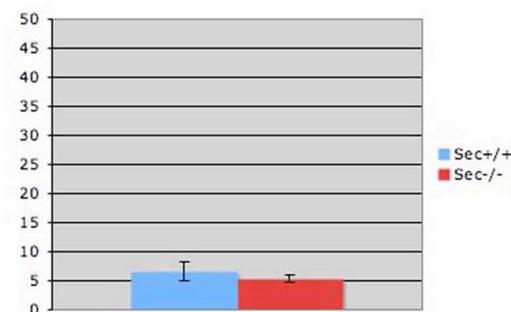


Abb. 3.14 Das Diagramm zeigt die Prozentzahlen defekter Ana- oder Telophasen von je 75 ausgewerteten HCT116 Wildtyp und HCT116 hSecurin^{-/-} Zellen aus je 3 verschiedenen Passagen.

Alle beobachteten Anaphasendefekte der Knockout Linie waren gekennzeichnet durch lediglich ein bis zwei fehlverteilte Chromatiden. Massive Chromatiden Segregationsdefekte mit mehreren fehlverteilten Chromatiden, wie bei Jallepalli et al beschrieben wurden nie beobachtet (Jallepalli et al., 2001).

3.1.4 Spezifische PCR zur Überprüfung des Securin Knockouts

Um sicherzustellen, dass nicht versehentlich eine Vermischung der Knockout- mit der Wildtyp-Zelllinie stattgefunden hat, wurden zu verschiedenen Passagezahlen spezifische PCRs mit Primern für die deletierte Region durchgeführt. Als Kontrolle wurde im selben Ansatz jeweils stets auch DNA der Wildtyp-Linie analysiert. Insgesamt wurden 2 Primerpaare für die Region um Exon 3 des Securingens verwendet. (Abb. 3.15). Bei der Primerkombination PTTGR6 / PTTGR1 bindet einer der Primer (PTTGR1) im deletierten Bereich, was zur Folge hat, dass DNA der Knockout Zelllinie mit diesem Primerpaar nicht amplifiziert werden kann. Bei jedem PCR Ansatz mit dieser Primerkombination entstand lediglich mit DNA des Wildtyps ein ca. 500 bp großes Amplifikationsprodukt, welches auf dem Gelbild deutlich zu erkennen ist (Abb. 3.16). DNA aus der Knockout Zelllinie wurde nicht amplifiziert. Die Verwendung eines Primerpaares für Exon 8/9 des Tp53 Gens diente als Positivkontrolle und ergab bei beiden Zelllinien ein Amplifikationsprodukt von ca. 400 bp. Zusätzlich wurde eine PCR mit den Primern Sec P1l und SecP2r durchgeführt, welche ein Stück up- bzw downstream des deletierten Bereiches binden. Auf dem entsprechenden Gelbild ist zu erkennen, dass das Amplifikationsprodukt der hSecurin-/- Zellen mit dieser Primerkombination etwa 200 bp kürzer als das des Wildtyps ist (Abb. 3.16). Dies entspricht in etwa der Größe des deletierten Exon 3. Abbildung 3.15 veranschaulicht die Bindungsstellen der Primerpaare auf dem Securingen.

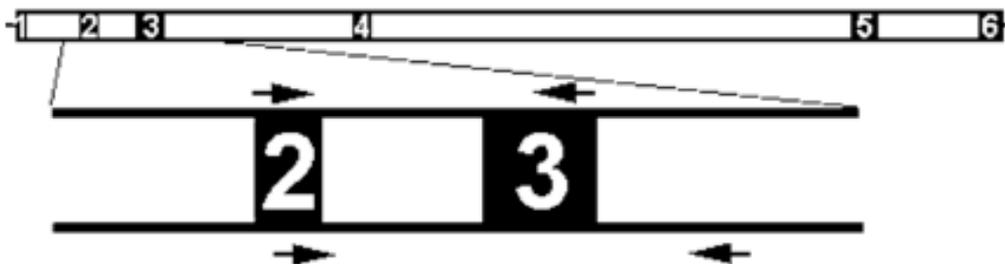


Abb. 3.15: Exon 2 und 3 des Securingens mit Bindungsstellen der Primerkombinationen PTTGR1/PTTGR6 (obere Pfeile) und SecP1/P2r (untere Pfeile).

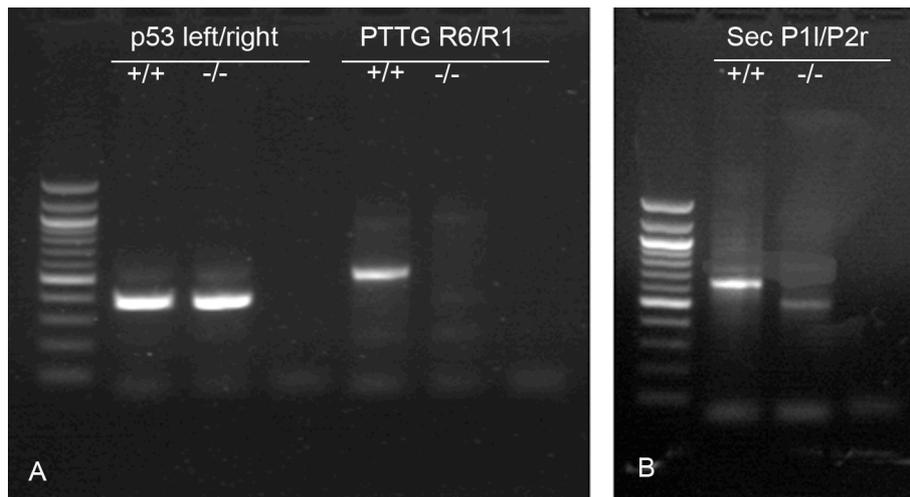


Abb. 3.16: Amplifikationsprodukte der spezifischen PCR.

A.) Amplifikationsprodukte der Zelllinien HCT116 Wildtyp (+/+) und HCT116 hSecurin^{-/-} (-/-) mit der Primerkombination p53 left und p53 right und der Primerkombination PTTGR1 und PTTGR6
 B.) Amplifikationsprodukte der Zelllinien HCT116 Wildtyp (+/+) und HCT116 hSecurin^{-/-} (-/-) mit der Primerkombination Sec P11 und SecP2r.

3.1.5 Separase-Quantifizierung

Durch Western Blot Analysen mit einem Antikörper gegen Separase (Sep N) wurde getestet, ob chromosomal stabile HCT116 hSecurin^{-/-} Zellen noch die von Jallepalli et al. beschriebenen reduzierten Level an Separase aufweisen, welche in Kombination mit der reduzierten Separase Aktivität ursprünglich als mögliche Ursache für die Anaphasendefekte diskutiert wurde (Jallepalli et al., 2001). Die Expression der Separase steigt bei normalen Zellen in der Mitose stark an und erreicht ihr Maximum zu Beginn der Anaphase. Daher war es bei dieser quantitativen Analyse essentiell, synchronisierte Zellen der gleichen Zellzyklusphase zu untersuchen. Mit einem Cyclin B1 Antikörper wurde überprüft, ob die Synchronisierung bei beiden Zelllinien erfolgreich war. Cyclin B1 wird unmittelbar vor Beginn der Anaphase abgebaut, wodurch es möglich war, Zellen vor und nach Beginn der Teilungsphase voneinander zu unterscheiden. Beide Zelllinien wurden jeweils direkt nach 14 Std. Nocodazol Arrest und nach einer Release Phase von weiteren 3 Stunden mit dem beschriebenen Cyclin B1-spezifischen Antikörper im Western Blot analysiert.

Die Zelllinien (Abb. 3.17) zeigten nach 3 Stunden Nocodazol Release eine deutliche Abnahme des Cyclin B1 Signals im Western Blot. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Zelllinien sich in den, für die Analysen optimalen, Zellzyklusphasen befanden. Als Ladekontrolle wurde β -Tubulin nachgewiesen.

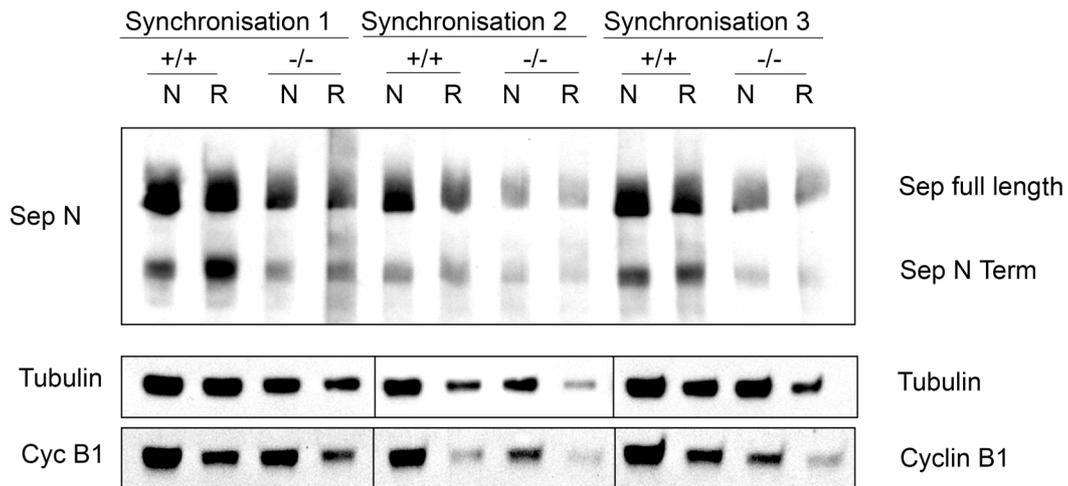


Abb. 3.17: Western Blot von HCT116 Wildtyp (+/+) und HCT116 hSecurin -/- Zellen (-/-) aus 3 Synchronisierungen. Die Blots wurden mit Zellen direkt nach dem Nocodazol Arrest (N) und nach einer dreistündigen Release Phase (R) durchgeführt. In allen Blots ist die Abnahme des Cyclin B1 Signals nach dem Release zu erkennen, die Zellmengen sind in der ersten Synchronisierung am ähnlichsten (Tubulinfärbung).

Anschließend wurden gleiche Zellmengen HCT116 hSecurin-/- und HCT116 hSecurin+/+ eingesetzt, um Separase mit einem spezifischen Antikörper gegen den N-Terminus von Separase quantitativ zu bestimmen. Wie aus Abb. 3.18 ersichtlich, war die Menge an nachgewiesener Separase full length (p200 Form, ca 200 kDa), sowie an Separase N-Terminus (p60 Form) bei chromosomal stabilen hSecurin-/- Zellen hierbei im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Erst beim Western Blot mit der 4-fachen Ausgangszellmenge hSecurin-/- konnten gleiche Mengen an Separase nachgewiesen werden. Hieraus ließ sich also einfach ableiten, dass Wildtyp Zellen im Gegensatz zu Zellen ohne Securin die vierfache Menge an Separase aufweisen.

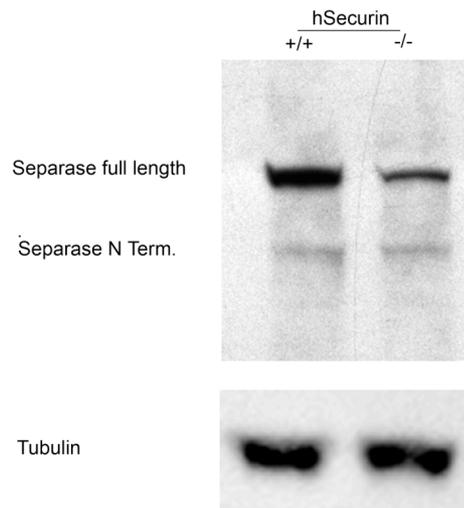


Abb. 3.18 Separase Quantifizierung von HCT116 hSecurin^{+/+} und HCT116 hSecurin^{-/-} Zellen mittels Western Blot.

3.1.6 Separase-Aktivitätstest:

Während der Anaphase findet eine Separase Selbstspaltung statt, wodurch ein carboxyterminales- (C) und ein aminoternales- (N) Fragment entsteht. Durch diese Selbstspaltung wird Separase aktiviert und kann seine proteolytische Aktivität gegenüber SCC1 entfalten. Es wurde getestet, ob immunopräzipitierte Separase aus hSecurin^{-/-} Zellen in der Lage ist, in vitro translatiertes ³⁵S-SCC1 zu schneiden. Um gleiche Mengen Separase in beiden Zelllinien zu untersuchen, wurde die 4-fache Menge an Ausgangszellmaterial hSecurin^{-/-} eingesetzt. Bereits nach 20 min Inkubation der aktivierten Separase mit ³⁵S-SCC1 konnte bei HCT116 Wildtyp Zellen mit SDS PAGE und Autoradiographie ein SCC1-Spaltfragment nachgewiesen werden (Abb. 3.19). Die Menge des Spaltproduktes stieg nach einer Inkubationszeit von 90 min nachweisbar an.

Separase aus der Knockout-Linie hingegen zeigte in den beschriebenen Konzentrationen keine Aktivität nach 20 und 90 min Inkubation.

Bei gleicher Separase Ausgangsmenge, wird also in Securin-Knockout-Zellen SCC1 nicht mit der gleichen Effektivität wie in Wildtyp-Zellen geschnitten.

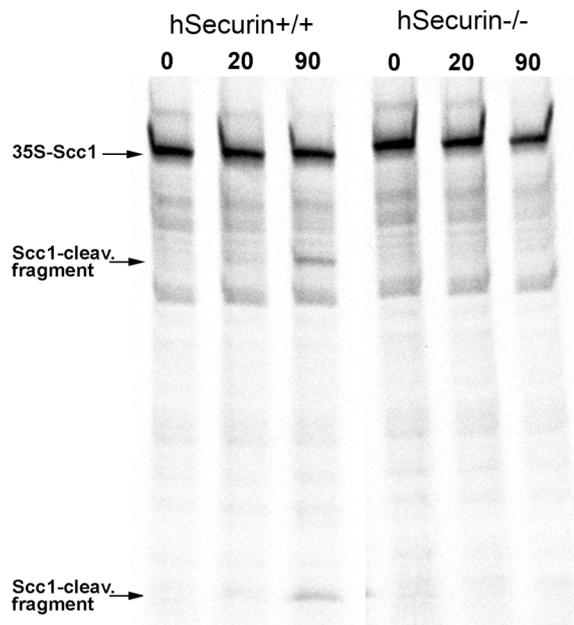


Abb. 3.19: SCC1 Spaltung bei in Xenopus Extrakt aktivierten hSecurin+/+ und hSecurin-/- Zellen nach 0, 20 und 90 min Inkubation mit ³⁵S SCC1.

Zusätzlich wurde ein Western Blot der immunpräzipitierten Separase aus beiden Zelllinien vor- und nach Inkubation in Xenopus Extrakt durchgeführt. Aus dem Blot ist ersichtlich, dass das Separase Selbstspaltprodukt vor Zugabe von Extrakt in Knockout Zellen in weitaus größeren Mengen vorliegt. Beim Wildtyp war diese Bande erst nach Zugabe des Extraktes deutlich zu erkennen (Abb.3.20).

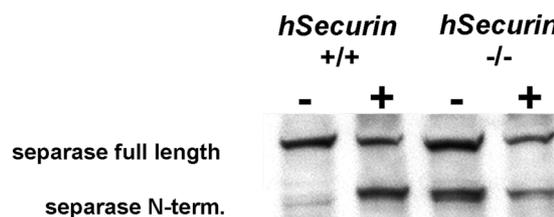


Abb.3.20: Separase Selbstspaltung von hSecurin+/+ und hSecurin-/- Zellen vor (-) und nach Inkubation in Xenopus Extrakt. Die N-Terminus Bande ist bei hSecurin -/- Zellen im Gegensatz zu Wildtyp Zellen bereits vor Inkubation in Extrakt deutlich zu sehen.

3.1.7 Genexpressionsanalysen von HCT116 und HCT116hSecurin^{-/-} Zellen

Um zu untersuchen, wie ein Securin Knockout sich auf transkriptioneller Ebene auf andere Gene auswirkt, und um auf mögliche Backup Systeme in Zellen ohne Securin hin zu testen, wurde eine vergleichende Genexpressionsanalyse von HCT116 hSecurin^{-/-} Zellen und HCT116 Wildtyp Zellen durchgeführt. Insgesamt wurden 11 Proben auf den HG-U133 Chip hybridisiert, 6 Passagen HCT116 Wildtyp und 5 Passagen HCT116 hSecurin^{-/-}. Die Expressionsreporte, welche automatisch erstellt werden, ließen erkennen, dass alle Proben gut hybridisiert hatten. Der Hintergrund (Background) aller Hybridisierungen lag im Normalbereich unter 200. Die Anzahl der "present calls" lag bei keiner der Hybridisierung unter 40%. Anhand der Hybridisierungsverteilung der Housekeeping Gene konnte davon ausgegangen werden, dass die in vitro Translation korrekt stattgefunden hat. Das Hybridisierungsverhalten der Proben, die auf dem Chip das Securingen abdecken, konnte als zusätzliche Kontrolle gewertet werden, um eine Verwechslung der beiden Zelllinien auszuschließen. Die Expression aller 11 Securin Proben der Wildtyp Zelllinie war klar nachweisbar, während bei der Knockout Linie die Probe für Exon 3 in keinem der 5 Replika ein messbares Signal lieferte.

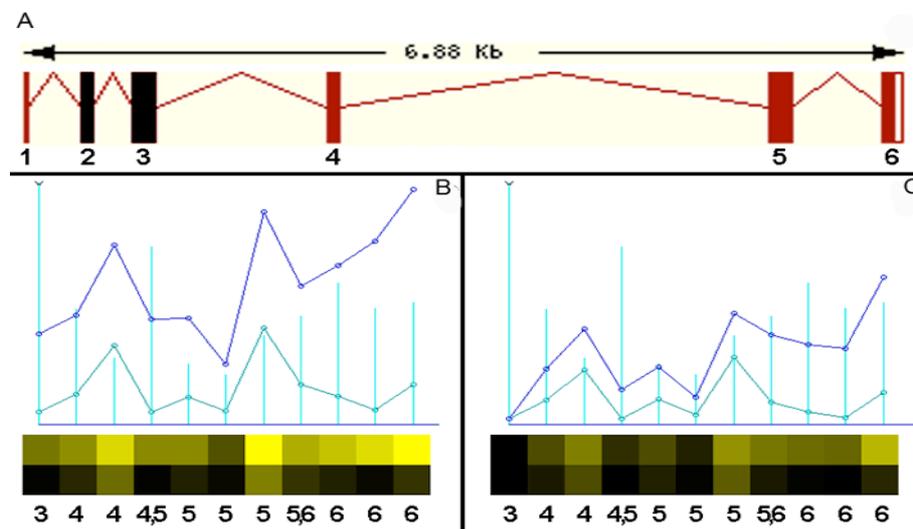


Abb. 3.21: (A): hSecurin Transkript mit 6 Exons (www.ensembl.org). Exons 2 und 3, die durch homologe Rekombination deletiert wurden, sind in schwarz dargestellt. (B)-(C): Affymetrix Genexpressionsdaten von HCT116 Wildtyp (B) und HCT116 hSecurin^{-/-} (C). Die Intensitätskurven für die "perfect match" Daten wird in blau dargestellt, die Intensitätskurven für die "mismatch" Daten in grün. Unter den Kurven werden die entsprechenden Intensitätsbilder in einer schwarz-gelb Skala dargestellt, wobei schwarz keine Expression und hellgelb hohe Expression bedeutet. Die obere Reihe entspricht dem Intensitätsplot der "perfect match" Proben, die untere Reihe der der "mismatch" Proben. Das hSecuringen wird auf dem HG U133 Array durch 11 verschiedene Oligos aus verschiedenen Exons (3,4,5 und 6) repräsentiert, die als Balken unter den Intensitätswerten aufgezeigt sind.

Zur Errechnung der signifikanten Expressionunterschiede der beiden Zelllinien wurden die beschriebenen statistischen Algorithmen "Supportive Vector Machine (SVM)" und "Recursive feature Elimination" angewandt. Anschließend wurden 2 Listen der 40 hochsignifikant unterschiedlich exprimierten Gene erstellt. Für die Erstellung der ersten Liste (Tab. 3.5) wurden nur Expressionswerte mit einem MAS5p-Wert kleiner als 0,04 in die Recursive feature elimination Analyse einbezogen und alle anderen Werte wurden als "missing" gewertet. Die zweite Liste (Tab 3.6) ist das Ergebnis einer Untersuchung aller Werte mittels des Support Vector Machine" (SVM) Algorithmus, ungeachtet des p-Wertes. Die beiden Listen unterscheiden sich, bedingt durch die unterschiedlichen Analysemethoden offensichtlich in einigen Genen. Durch Datenbankvergleiche wurden 3 der aufgelisteten Gene (Plk2, Liste1: Rank 7; SMC6, Liste 1 Rank 19; RCC1, Liste 1 Rank 37) anhand ihrer Funktion im Zellzyklus als besonders interessant befunden. Die Intensitätswerte mit Standardabweichungen dieser 3 Gene werden in Abb. 3.22 grafisch dargestellt. Weiterhin wurde das Expressionsverhalten einiger, in der Literatur im Zusammenhang mit Securin beschriebenen Gene genauer betrachtet, obwohl sie sich nicht auf der Liste fanden. Die Expressionswerte dieser Gene werden ebenfalls in Abb. 3.22 dargestellt. Eines dieser beschriebenen Gene ist Tp53. Es wurde bereits mit dem selben Zellsystem gezeigt, dass Securin zwar auf Proteinebene mit p53 interagiert, nicht jedoch die Transkription beeinflusst (Bernal et al., 2002). Dieses Ergebnis konnte bestätigt werden. Ebenso wurde keine unterschiedliche Expression der Securin Pseudogene PTTG2 und PTTG3 gefunden, was bedeutet, dass die wiedererlangte Stabilität in Knockout Zellen wohl nicht auf die Expression der Pseudogene zurückzuführen ist.

Rank	Affymetrix ID	Description
1	218628_at	CGI-116 protein
2	221731_x_at	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)
3	203789_s_at	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C
4	208891_at	dual specificity phosphatase 6
5	221911_at	hypothetical protein LOC221810
6	204620_s_at	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)
7	201939_at	serum-inducible kinase
8	214792_x_at	vesicle-associated membrane protein 2 (synaptobrevin 2)
9	202551_s_at	cysteine-rich motor neuron 1
10	203455_s_at	spermidine/spermine N1-acetyltransferase
11	218718_at	platelet derived growth factor C
12	201996_s_at	SMART/HDAC1 associated repressor protein
13	200907_s_at	Paladin
14	209457_at	dual specificity phosphatase 5
15	213907_at	eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon 1
16	212096_s_at	mitochondrial tumor suppressor gene 1
17	208611_s_at	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)
18	205347_s_at	thymosin, beta, identified in neuroblastoma cells
19	218781_at	SMC6 structural maintenance of chromosomes 6-like 1 (yeast)
20	215913_s_at	PTB domain adaptor protein CED-6
21	206805_at	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A
22	206235_at	ligase IV, DNA, ATP-dependent
23	203571_s_at	adipose specific 2
24	202552_s_at	cysteine-rich motor neuron 1
25	210592_s_at	spermidine/spermine N1-acetyltransferase
26	207688_s_at	inhibin, beta C
27	201560_at	chloride intracellular channel 4
28	200906_s_at	Paladin
29	210317_s_at	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide
30	214060_at	single-stranded DNA binding protein
31	203736_s_at	PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1)
32	217780_at	PTD008 protein
33	213988_s_at	spermidine/spermine N1-acetyltransferase
34	204619_s_at	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)
35	210813_s_at	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4
36	209771_x_at	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)
37	206499_s_at	chromosome condensation 1
38	221997_s_at	mitochondrial ribosomal protein L52
39	203186_s_at	S100 calcium binding protein A4 (calcium protein, calvasculin, metastasin, murine placental homolog)
40	212106_at	expressed in T-cells and eosinophils in atopic dermatitis

Tab. 3.5: Die Liste zeigt die Top 40 Liste der in hSecurin+/+ und hSecurin-/- Zellen signifikant unterschiedlich exprimierten Gene, welche mittels "Recursive feature elimination" mit einem MAS5 p-Wert kleiner als 0,04 ermittelt wurden.

Rank	Affymetrix ID	Description
1	200665_s_at	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
2	202489_s_at	FXYD domain containing ion transport regulator 3
3	215646_s_at	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)
4	221645_s_at	zinc finger protein 83 (HPF1)
5	210445_at	fatty acid binding protein 6, ileal (gastrotropin)
6	202600_s_at	nuclear receptor interacting protein 1
7	211571_s_at	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)
8	211470_s_at	sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 1
9	215392_at	Sapiens cDNA FLJ14136 fis, clone MAMMA1002744.
10	219049_at	chondroitin beta1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase
11	216633_s_at	KIAA1069 protein
12	221884_at	ecotropic viral integration site 1
13	215514_at	Sapiens mRNA; cDNA DKFZp564M0616 (from clone DKFZp564M0616)
14	206432_at	hyaluronan synthase 2
15	209772_s_at	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)
16	205399_at	doublecortin and CaM kinase-like 1
17	202388_at	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa
18	202599_s_at	nuclear receptor interacting protein 1
19	215029_at	Sapiens mRNA; cDNA DKFZp586E2317 (from clone DKFZp586E2317)
20	215782_at	RAB40A, member RAS oncogene family
21	212671_s_at	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1
22	217388_s_at	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)
23	221076_at	PRO1770 protein
24	216011_at	Sapiens, clone IMAGE:4776814, mRNA
25	207889_at	sarcosine dehydrogenase
26	203397_s_at	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GalNAc-T3)
27	214858_at	Sapiens clone 24566 mRNA sequence
28	212667_at	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
29	206675_s_at	SKI-like
30	204619_s_at	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)
31	221731_x_at	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)
32	211145_x_at	interferon, alpha 21
33	214422_at	RAD23 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)
34	210994_x_at	ADP-ribosylation factor domain protein 1, 64kDa
35	218628_at	CGI-116 protein
36	205269_at	lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa)
37	217649_at	zinc finger protein 216
38	210287_s_at	fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)
39	208043_at	gb:NM_020484.1 /DEF=Homo sapiens RAGE binding protein (AF011757), mRNA. /FEA=mRNA /GEN=AF011757 /PROD=RAGE binding protein /DB_XREF=gi:10048411 /UG=Hs.105937 RAGE binding protein /FL=gb:NM_020484. ...
40	202222_s_at	desmin

Tab. 3.6: Die Liste zeigt die Top 40 Liste der in hSecurin+/+ und hSecurin-/- Zellen signifikant unterschiedlich exprimierten Gene, welche mittels "Support Vector Maschine" ohne Einbeziehung eines p-Wert ermittelt wurden.

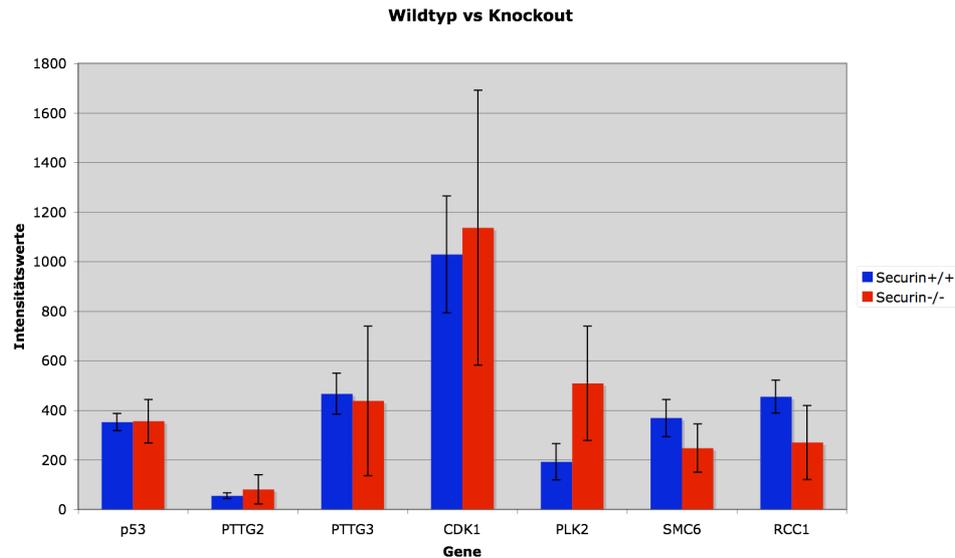


Abb. 3.22: Gezeigt werden die mittleren Expressionswerte einiger ausgewählter Gene mit Standardabweichungen.

3.1.8 siRNA Analysen

Wie in Kapitel 3.1.7 erwähnt, war das Genprodukt Plk2 in Securin Knockout Zellen im Vergleich zum Wildtyp signifikant hochreguliert. Datenbankvergleiche ließen die Hypothese zu, dass Plk2 möglicherweise in späteren Passagen einen stabilisierenden Einfluss auf das Genom der Knockoutzellen gehabt haben könnte. Um zu testen, ob ein Plk2 Knockdown sich auf die chromosomale Stabilität von hSecurin Knockout Zellen auswirkt, wurde Plk2 sowohl in der hSecurin^{-/-} Linie, als auch in der Wildtyp Linie als Kontrolle mittels siRNA herunterreguliert. Hierfür wurden 3 verschiedene Plk2 siRNA Oligos verwendet. Zur Überprüfung der Effizienz der Knockdowns wurde jedoch zunächst, zusätzlich zur siRNA Transfektion, ein Myc-Plk2 Plasmid in die Wildtyp-Zelle transfiziert. Anschließend wurde das Myc-Protein im Western Blot nachgewiesen.

Abb. 3.23 verdeutlicht, dass der Knockdown mit allen 3 Plk2 siRNA Oligos ("alt1", "alt2" und "SMART") nachweislich gut funktioniert hat. Der effizienteste Knockdown fand jedoch mit dem "SMART" siRNA Oligo von Dharmacon statt (Spuren 8 und 9). Für alle weiteren Knockdown Versuche wurde deshalb dieser Oligo verwendet. Anschließend wurden die beiden Zelllinien mittels Interphase-FISH mit chromosomenspezifischen Zentromerproben auf Aneuploidien hin untersucht. Als Negativkontrolle dieser Analysen diente der siRNA Oligo für das Gen Luciferase, welches in humanen Zellen nicht exprimiert wird. Zusätzlich wurde der beschriebene MAD2 Oligo als Positivkontrolle verwendet.

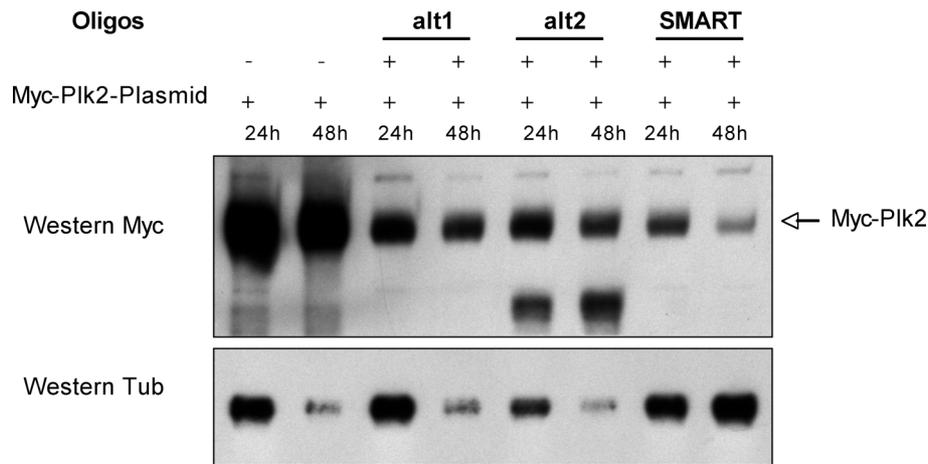


Abb. 3.23: Myc Western Blot der siRNA Knockdown Versuche Zelllinie HCT116 mit verschiedenen Oligos für Plk2. Die untere Reihe zeigt die β Tubulin Ladekontrolle.

Die Balkendiagramme in Abb. 3.24 zeigen, dass in Securin Knockout Zellen 24 Std. nach der Transfektion mit dem Plk2 siRNA Oligo im Vergleich zur Negativkontrolle keine erhöhte chromosomale Instabilität beobachtet werden konnte. In einem Versuch nach einer 48-stündigen Transfektion mit dem Plk2 Oligo wurde eine leicht erhöhte Aneuploidienrate im Vergleich zur Leerkontrolle beobachtet (Abb. 3.25; 3.27). Diese konnte jedoch im Wiederholungsexperiment nicht bestätigt werden (Abb. 3.26). Auch 72 Std. nach der Transfektion wurden keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle festgestellt (Abb. 3.28; 3.29). Die Positivkontrolle mit dem siRNA Oligo für MAD2 zeigte hingegen bereits nach 48h eine deutlich erhöhte chromosomale Instabilität (Abb. 3.30).

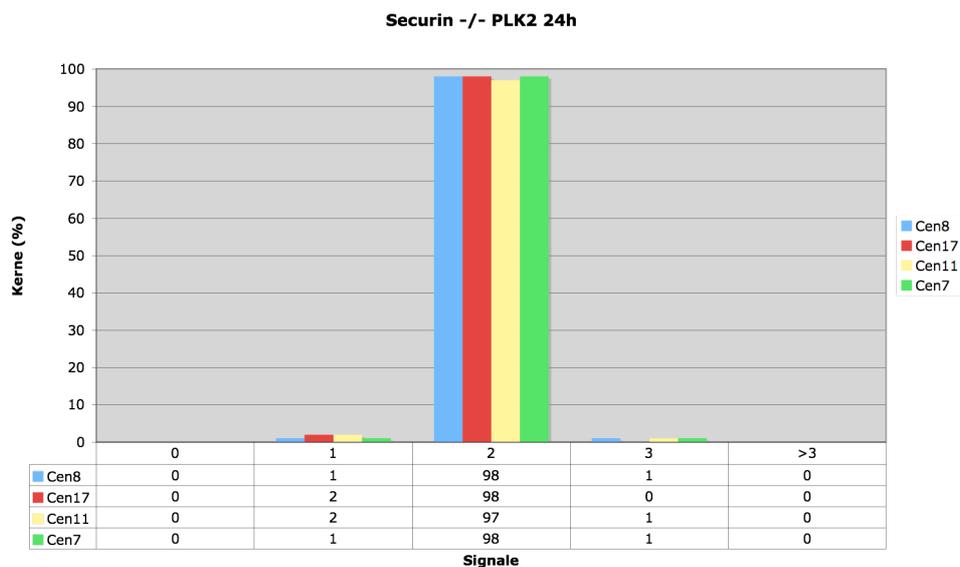


Abbildung 3.24: Das Diagramm zeigt die Daten von 100 ausgezählten Kernen der Zelllinie HCT116 hSecurin^{-/-} nach 24h Transfektion mit dem Plk2 siRNA Oligo.

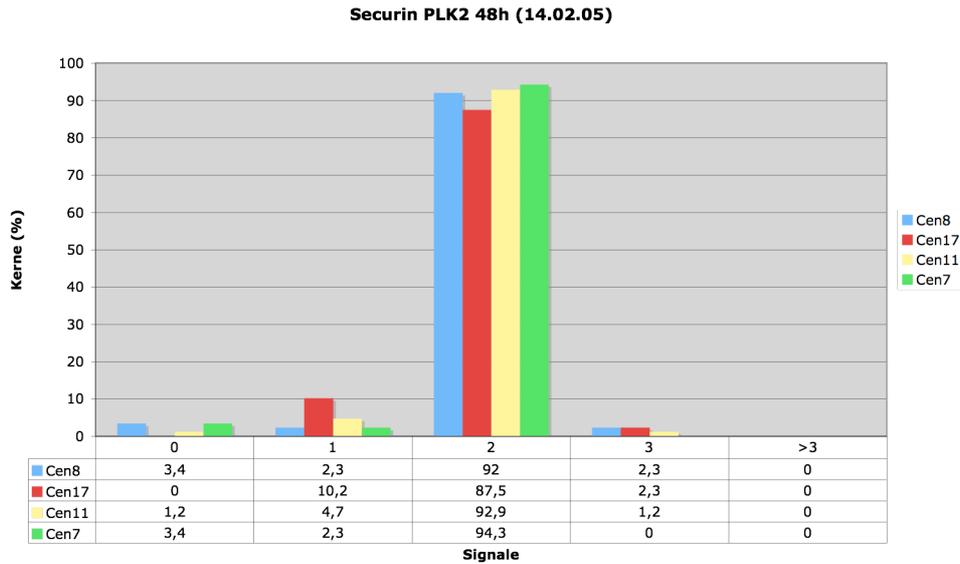


Abb. 3.25: Das Diagramm zeigt die Daten von 100 ausgezählten Kernen der Zelllinie HCT116 hSecurin^{-/-} nach 48h Transfektion mit dem Plk2 siRNA Oligo.



Abb. 3.26: Das Diagramm zeigt die Daten von 100 ausgezählten Kernen der Zelllinie HCT116 hSecurin^{-/-} nach 48h Transfektion mit dem Plk2 siRNA Oligo im Wiederholungsexperiment.

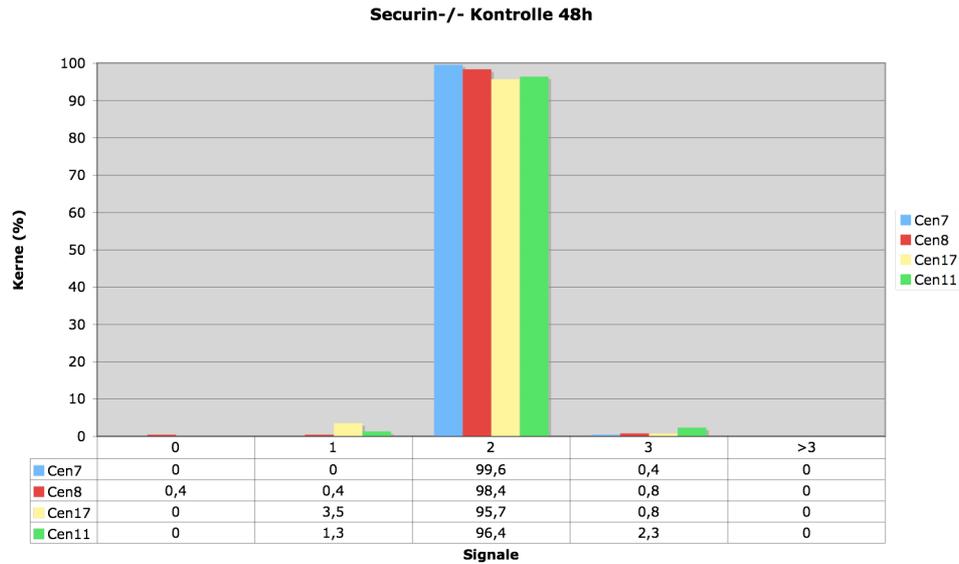


Abb. 3.27 Das Diagramm zeigt die Daten von 100 ausgezählten Kernen der Zelllinie HCT116 hSecurin-/- nach 48h Transfektion mit dem siRNA Oligo für das Gen Luciferase (Negativkontrolle).



Abb. 3.28: Das Diagramm zeigt die Daten von 100 ausgezählten Kernen der Zelllinie HCT116 hSecurin-/- nach 72h Transfektion mit dem Plk2 siRNA Oligo.

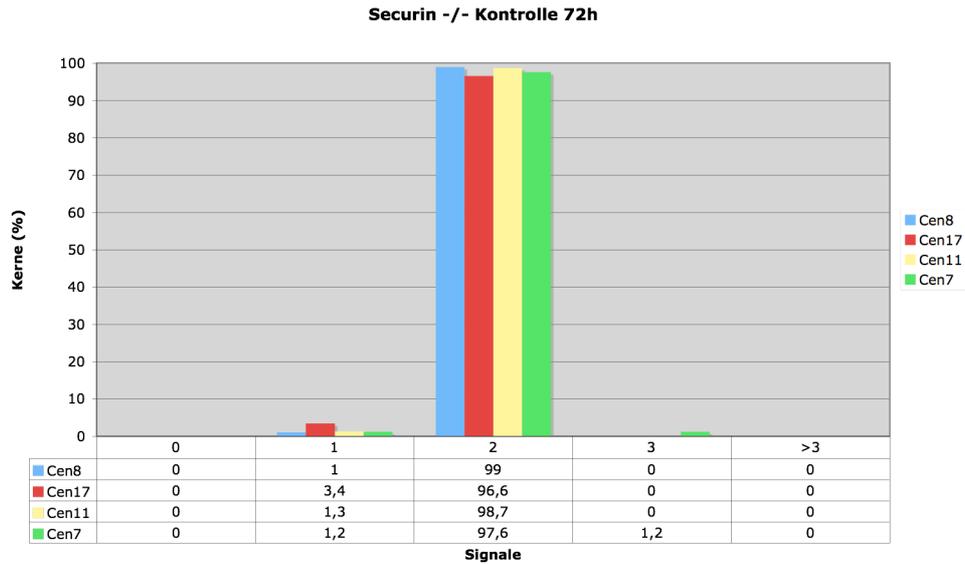


Abb. 3.29: Das Diagramm zeigt die Daten von 100 ausgezählten Kernen der Zelllinie HCT116 hSecurin^{-/-} nach 72h Transfektion mit dem siRNA Oligo für das Gen Luciferase (Negativkontrolle).

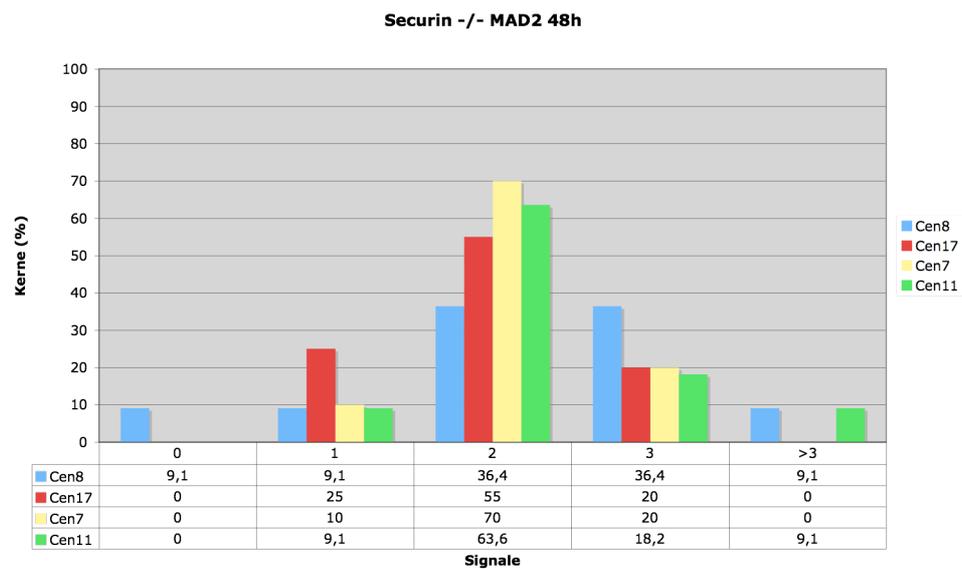


Abb. 3.30: Das Diagramm zeigt die Daten von 100 ausgezählten Kernen der Zelllinie HCT116 hSecurin^{-/-} nach 48h Transfektion mit dem siRNA Oligo für das MAD2 Gen (Positivkontrolle).

3.2 Analyse der Knockout Zelllinien HCT116 hCDC4^{-/-} und DLD1 hCDC4^{-/-}

Um zu testen, wie sich ein Knockout des Gens hCDC4 auf die chromosomale Stabilität der MIN- Zelllinien HCT116 und DLD1 auswirkt, wurden zunächst Interphase-FISH Analysen mit chromosomenspezifischen Zentromersonden durchgeführt. Als zusätzlichen Marker für chromosomale Instabilität wurden Mikronuklei ausgezählt, wie auch in der Arbeit von Rajagopalan et al. beschrieben (Rajagopalan et al., 2004). Anschließend wurde mittels einer spezifischen PCR mit Primern für die deletierte Region nachgewiesen, dass keine Vermischung der Knockout- und Wildtyp Zelllinien stattgefunden hat. Mittels M-FISH bzw. Bänderungsanalysen wurden die Knockout- und Wildtypzelllinien karyotypisiert.

3.2.1 Interphase FISH-Analysen mit Zentromersonden

Es wurden von jeder Zelllinie insgesamt 300 Kerne aus 3 verschiedenen Passagen mit Interphase-FISH analysiert. Als Kontrolle wurden Kerne aus 3 Passagen der Wildtyp Zelllinien ausgezählt. Jede der 4 Zelllinien wurde außerdem parallel im Labor von Dr. Heiko Hermeking (Institut für Molekulare Zellbiologie, Max Planck Institut für Biochemie, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Deutschland) kultiviert, wodurch ausgeschlossen werden konnte, dass spezielle Kulturbedingungen in unserem Labor für die beobachteten Phänomene verantwortlich sind. Wie in Abb. 3.31 zu sehen ist, waren die Hybridisierungen stets gut auswertbar. Abb. 3.32 und folgende zeigen die Balkendiagramme der Auszählungen von Knockout Zelllinien und Wildtyp.

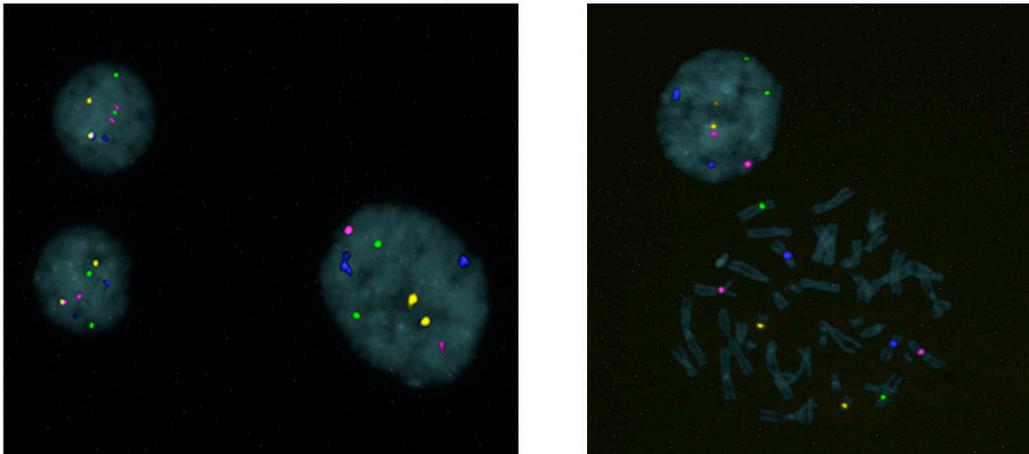


Abb. 3.31:

Die Abbildung zeigt 2 Interphase FISH Bilder der Knockout Zelllinie HCT116 hCDC4^{-/-}. Die Kerne sind mit DAPI gegengefärbt. Die Signale der Hybridisierung eines 4 Farben Sondensets bestehend aus Zentromersonden für Chromosom 7 (Cy5,5, violett) 8 (FITC, grün), 17 (Cy3, gelb) und 11 (Cy5, blau) sind deutlich zu erkennen. Es sind in jedem der Kerne jeweils 2 Signale pro Zentromersonde vorhanden. Im rechten Bild ist eine Metaphase mit Y Chromosom zu sehen.

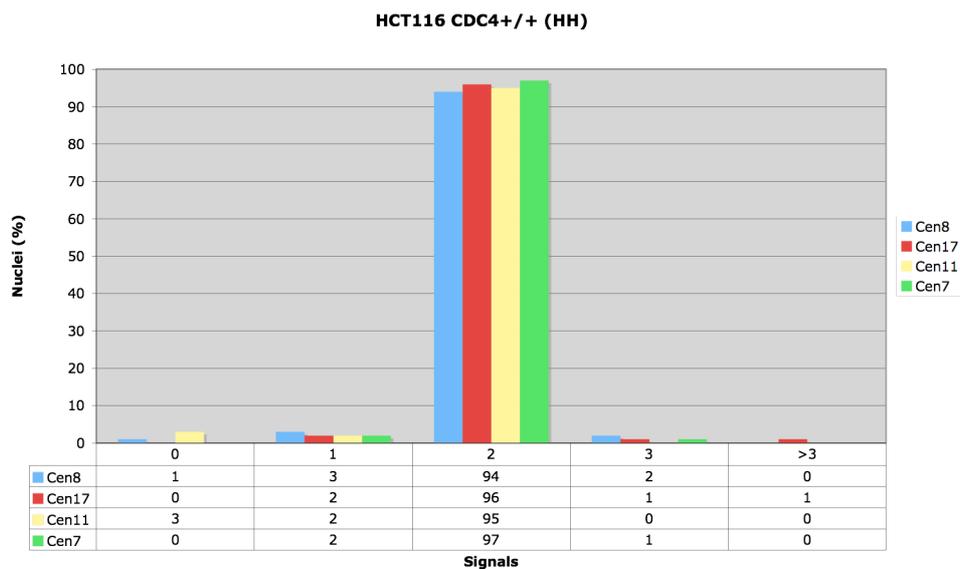


Abb. 3.32: Das Diagramm zeigt exemplarisch die Daten von 100 ausgezählten Kernen der Zelllinie HCT116 hCDC4^{+/+}. HH bedeutet Heiko Hermeking, in dessen Labor die Zelllinien kultiviert wurden.

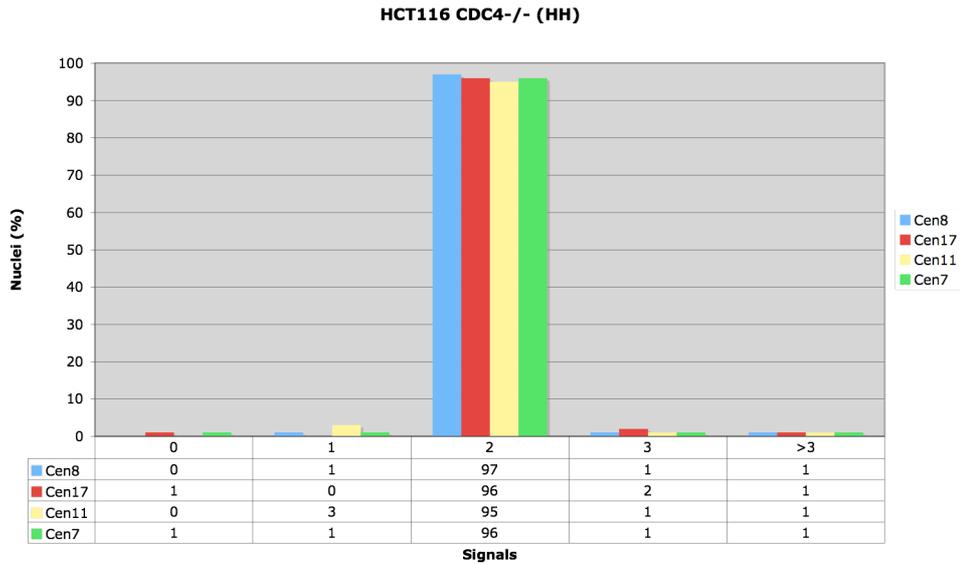


Abb. 3.33: Das Diagramm zeigt exemplarisch die Daten von 100 ausgezählten Kernen der Zelllinie HCT116 hCDC4^{-/-}. HH bedeutet Heiko Hermeking, in dessen Labor die Zelllinien kultiviert wurden.

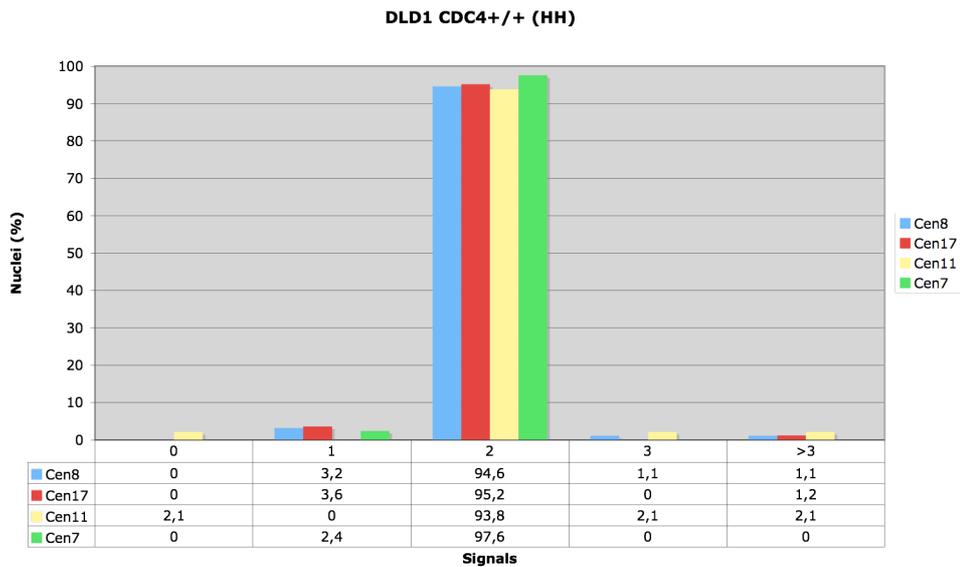


Abb. 3.34: Das Diagramm zeigt exemplarisch die Daten von 100 ausgezählten Kernen der Zelllinie DLD1 hCDC4^{+/+}. HH bedeutet Heiko Hermeking, in dessen Labor die Zelllinien kultiviert wurden.

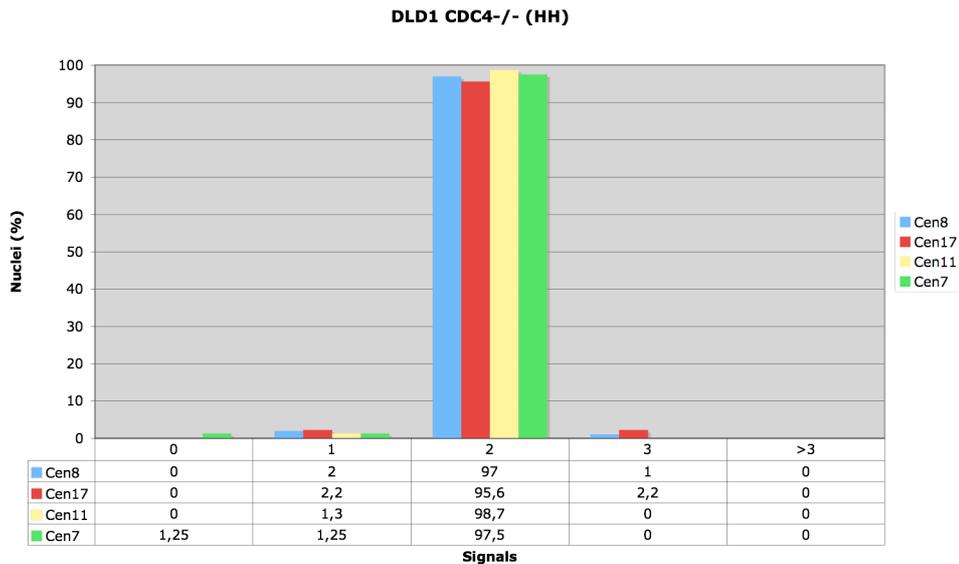


Abb. 3.35: Das Diagramm zeigt exemplarisch die Daten von 100 ausgezählten Kernen der Zelllinie DLD1 hCDC4^{-/-}. HH bedeutet Heiko Hermeking, in dessen Labor die Zelllinien kultiviert wurden.

Es war zwischen den beiden Knockout-Zelllinien kein signifikanter Unterschied zum jeweiligen Wildtyp im Hinblick auf die chromosomale Stabilität zu erkennen.

3.2.2 Auszählung von Mikronuklei

In der Arbeit von Rajagopalan et al. wurde in den Knockout Zelllinien HCT116 hCDC4^{-/-} und DLD1 hCDC4^{-/-} eine mit 18,3 %, bzw 22% im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypen (HCT116: 1%; DLD1: 0,9%) deutlich erhöhte Anzahlen an Mikronuklei nachgewiesen (Rajagopalan et al., 2004). Da die Auszählung von Mikronuklei möglicherweise ein sensitiveres Verfahren für die Erfassung der chromosomalen Instabilität von Zelllinien darstellt, wurden in der vorliegenden Doktorarbeit von jeder Zelllinie in unabhängigen Ansätzen 1000-3000 DAPI-gefärbte Zellen ausgezählt, um die Anzahl an Mikronuklei zu bestimmen. Diese Analysen wurden im Zuge einer Zusammenarbeit freundlicherweise von Dr. Marion Cremer (LMU München, Department Biologie II, Lehrstuhl für Anthropologie und Humangenetik, Großhaderner Strasse 2, 82152 Martinsried) verifiziert. Unten stehende Tabelle verdeutlicht das Ergebnis der Auszählungen. Um zu dokumentieren, dass die Untersuchungsergebnisse nicht von der jeweiligen Untersucherin abhängen, werden die Ergebnisse für beide Personen gesondert aufgeführt.

- Auszählung Katrin Pfleghaar

	Gezählte Zellen	Mikronuclei	%
DLD1 hCDC4 ^{-/-}	1850	65	3,5
DLD1 Wt	915	24	2,6
HCT116 hCDC4 ^{-/-}	2919	143	4,9
HCT116 Wt	4355	193	4,4

- Auszählung Dr. Marion Cremer

	Gezählte Zellen	Mikronuclei	%
DLD1 hCDC4 ^{-/-}	2163	65	3,0
DLD1 Wt	2145	34	1,6
HCT116 hCDC4 ^{-/-}	1074	51	4,7
HCT116 Wt	1755	72	4,1

Die Tabellen verdeutlichen, dass in HCT116 hCDC4^{-/-} Zellen kein signifikanter Anstieg der Mikronuklei Anzahl festgestellt werden konnte. Im Gegensatz hierzu wurde in DLD1 hCDC4^{-/-} Zellen ein Anstieg von ca 1,5 auf 3, bzw 2,6 auf 3,5% beobachtet. Die Werte unterschieden sich jedoch deutlich von den oben aufgeführten, ursprünglich publizierten Ergebnissen (Rajagopalan et al., 2004).

3.2.3 Spezifische PCR zur Überprüfung des Knockouts

Um zu überprüfen, ob die analysierten Zellen noch den Knockout aufweisen, wurden spezifische PCR Reaktionen mit Primern, die die deletierte Region um Exon 5 flankieren, durchgeführt.

Ein Amplifikationsprodukt mit einer Größe von etwa 500 kb zeigte sich nur mit DNA von Wildtyp Zellen. DNA der Zelllinien HCT116 hCDC4^{-/-} und DLD1 hCDC4^{-/-} wurde hingegen nicht amplifiziert. Als Positivkontrolle dienten Primer für Exon 8/9 des p53 Gens. Mit diesen Primern konnte DNA aus beiden Zelllinien amplifiziert werden. Abb. 3.36 zeigt das Gelbild der beschriebenen PCR Reaktionen.

Der Knockout konnte für die Zelllinien bestätigt werden, eine Vermischung mit Wildtyp Zellen konnte somit ausgeschlossen werden.

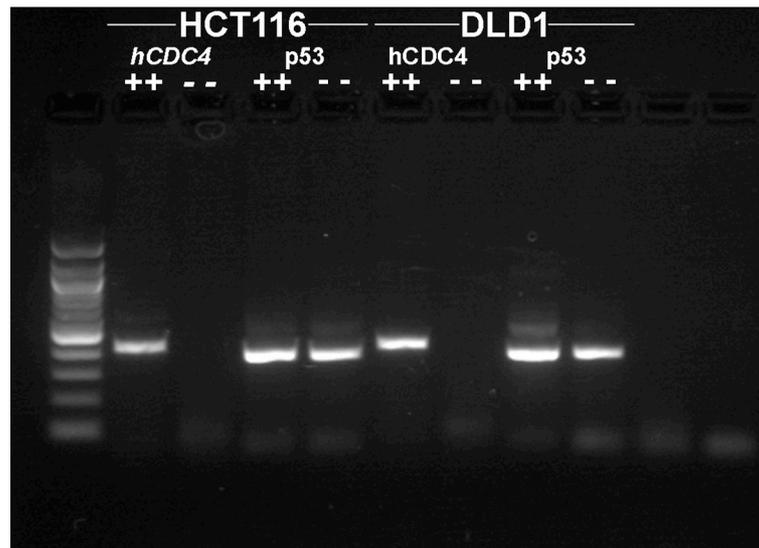


Abb. 3.36: Amplifikationsprodukte der spezifischen PCR Reaktionen
Das Gelbild zeigt die Amplifikationsprodukte der Zelllinien HCT116 Wildtyp, HCT116 hCDC4^{-/-}, DLD1 Wildtyp und DLD1 hCDC4^{-/-} mit der Primerkombination p53 left und p53 right und der Primerkombination CDC4 left und CDC4 right. In Spur 1 ist ein 100 bp Größenstandard aufgetragen, Spuren 10 und 11 sind Leerkontrollen.

3.2.4 M-FISH Analysen der Knockoutzelllinie HCT116 hCDC4^{-/-}

Um auf Abweichungen vom normalen Karyotyp der Zelllinie HCT116 zu testen, wurden 7 Fluorochrom M-FISH Analysen der Knockout Zelllinie HCT116 hCDC4^{-/-} durchgeführt.

Insgesamt wurden 10 Metaphasen karyotypisiert. Zusätzlich wurden auch der Wildtyp dieser Zelllinie (HCT116) noch einmal mit M-FISH untersucht.

Wie in Abb. 3.37 erkennbar, wies die Knockout Zelllinie, im Gegensatz zum Wildtyp, ein Y Chromosom auf. Literaturangaben zufolge ist die Zelllinie HCT116 heterogen und weist vereinzelt Klone mit Y Chromosom auf. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass der Knockout des hCDC4 Gens einen dieser seltenen HCT116 Klone getroffen hat. Darüber hinaus wurde in allen 10 untersuchten Metaphasen der Knockout Zelllinie ein komplexer Umbau beobachtet, der die Chromosomen 1, 4 und 16 betraf. In der parentalen Zelllinie wurde diese strukturelle Aberration nie gefunden.

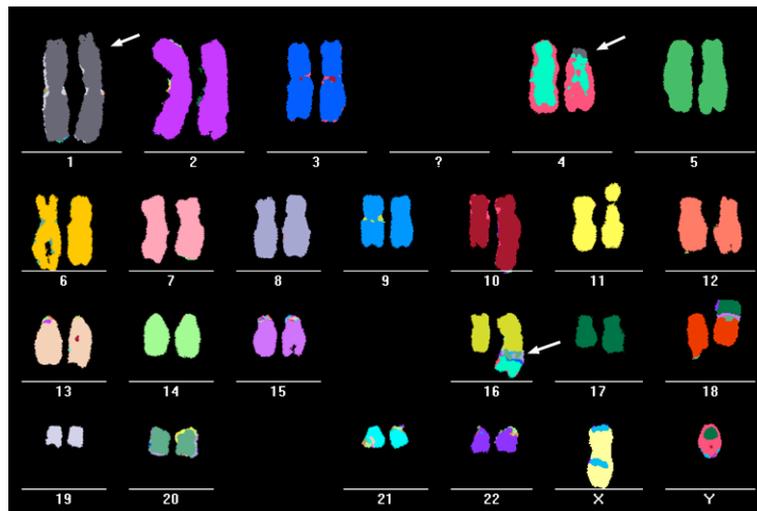


Abb. 3.37: Karyogramm der Zelllinie HCT116 hCdc4^{-/-} in den Klassifizierungsfarben. Die Pfeile zeigen die Chromosomen, die an dem komplexen Umbau beteiligt sind.

3.2.5 M-FISH- und Bänderungsanalysen der Knockoutzelllinie DLD1 hCDC4^{-/-}

Um zu testen, ob sich auch in der Knockout Zelllinie DLD1 hCDC4^{-/-} ein stabiler diploider Klon durchgesetzt hat, wurde der Wildtyp und hCDC4^{-/-} Knockout mit M-FISH- und Bänderungsanalysen untersucht (die Bänderungsanalysen wurden freundlicherweise von Corinna Keri, Institut für Humangenetik der TU München, Trogerstraße 32, 81675 München, Deutschland durchgeführt).

Es konnte jedoch in der Knockout Zelllinie keine klonale Veränderung festgestellt werden, die Mehrzahl der analysierten Metaphasen wiesen den ursprünglichen Karyotyp auf.

3.3 Vergleichende Analysen von chromosomal instabilen (CIN) Kolonkarzinomzelllinien und Kolonkarzinomzelllinien mit Mikrosatelliteninstabilität (MIN)

3.3.1 Genexpressionsanalysen

Insgesamt wurde cRNA von 5 Kolonkarzinomzelllinien mit Mikrosatelliteninstabilität (MIN) und 5 chromosomal instabilen Kolonkarzinomzelllinien (CIN) auf den Affymetrix HG U133 Chip hybridisiert.

MIN Zelllinien	CIN Zelllinien
DLD1	SW480
RKO	HT29
SW48	SW403
HCT116	CaCo2
LoVo	(SW837)

Tab. 3.7: Kolorektale CIN und MIN Zelllinien, die für die Genexpressionsanalysen verwendet wurden.

Alle Proben zeigten eine gute Hybridisierungsqualität. Da allerdings die Zelllinie SW837 keine Kolorektal- sondern eine Rektaltumorzelllinie ist und wahrscheinlich deshalb auch in ihrem Expressionsmuster stark von den restlichen CIN Linien abwich, wurde sie aus den statistischen Analysen herausgenommen. Mittels der unter 2.2.12.9 beschriebenen Algorithmen ANOVA und LiWong wurden die signifikant unterschiedlichen Gene ermittelt. Mit Hilfe der ebenfalls unter 2.2.12.9 beschriebenen Datenbanken wurde gezielt nach Funktion und Relevanz der signifikant unterschiedlich exprimierten Gene gesucht. Zusätzlich wurden in der Liste der Rohdaten die Intensitätswerte von Genen verglichen, welche in früheren Publikationen eine Unterscheidung von CIN und MIN Zellen ermöglichten. Bei der Auswertung fiel zunächst auf, dass 3 der hochsignifikanten Gene Ran-bindende Eigenschaften aufweisen und am Aufbau des Kernporenkomplexes (Nuclear Pore Complex/ NPC) beteiligt sind. Das Diagramm in Abb.3.38 fasst die Werte der in CIN und MIN Zellen unterschiedlich exprimierten Ran-bindenden Gene mit Standardabweichungen zusammen. Eines dieser Gene, das Gen für den Nuclear Transport Factor 2 (NUTF2/NTF2) zeigte auch bei einem Expressionsvergleich von

sehr alten (>90 Jahre) und jungen Menschen (20- 30 Jahre) signifikante Unterschiede. Diese Daten wurden ebenfalls während der Doktorarbeit erhoben (Geigl et al., 2004). Außerdem wurden auch einige weitere Gene mit zellzyklusregulatorischen Funktionen in unterschiedlich exprimierter Form gefunden. Die mittleren Intensitätswerte drei dieser Gene mit den jeweiligen Standardabweichungen werden in Abb. 3.39 dargestellt. Diese Gene, welche in CIN und MIN unterschiedlich exprimiert vorlagen, konnten auf Grund ihrer Funktion im APC/Wnt Signalweg oder Mikrotubuli-assoziiierter Eigenschaften in eine Gruppe zusammengefasst werden.

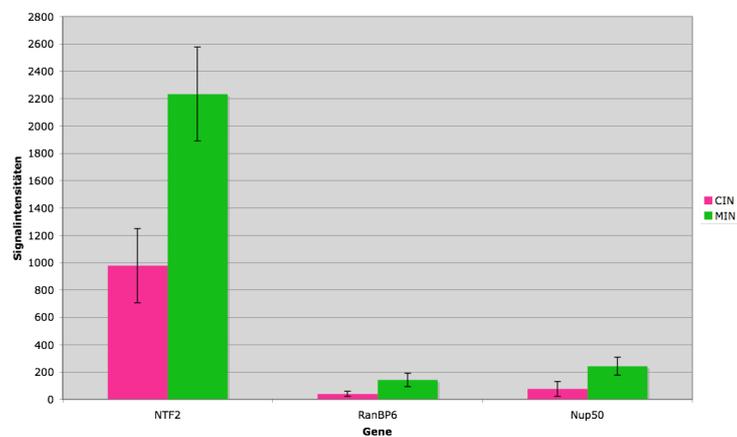


Abb. 3.38: Das Diagramm zeigt die mittleren Intensitätswerte mit Standardabweichungen von 3 Genen, deren Produkte am nukleozytoplasmatischen Transport beteiligt sind und/oder mit Ran interagieren.

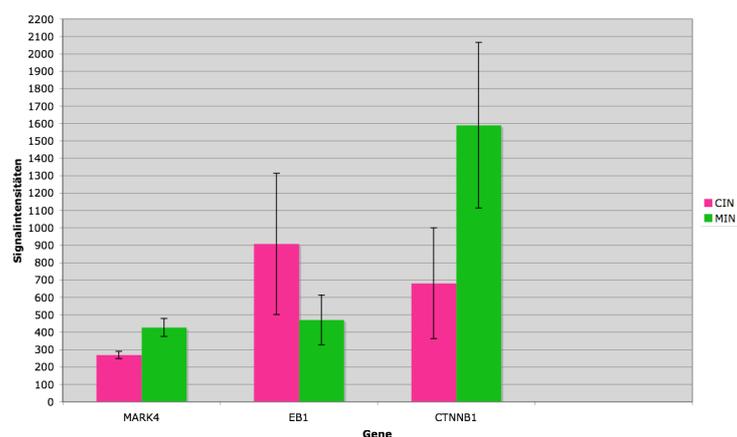


Abb. 3.39: Das Diagramm zeigt die mittleren Intensitätswerte mit Standardabweichungen einiger Gene, deren Produkte Mikrotubuli binden oder mit dem "Adenomatosis polyposis coli" (APC)-Genprodukt interagieren

Darüberhinaus wurden die Intensitätswerte von CIN und MIN Zellen für einige Gene verglichen, die in zwei anderen Publikationen zu diesem Thema als unterschiedlich exprimiert hervorgehoben wurden. Die mittleren Expressionswerte und Standardabweichungen dieser Gene werden in Abbildungen 3.40 und 3.41 dargestellt.

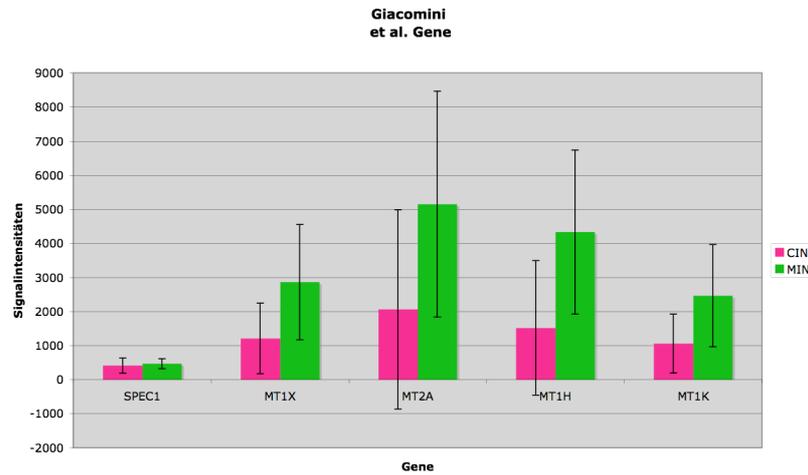


Abb.3.40: Das Diagramm zeigt die mittleren Intensitätswerte mit Standardabweichungen einiger Gene, die in der Arbeit von Giacomini et al. unterschiedlich exprimiert in CIN und MIN vorlagen.

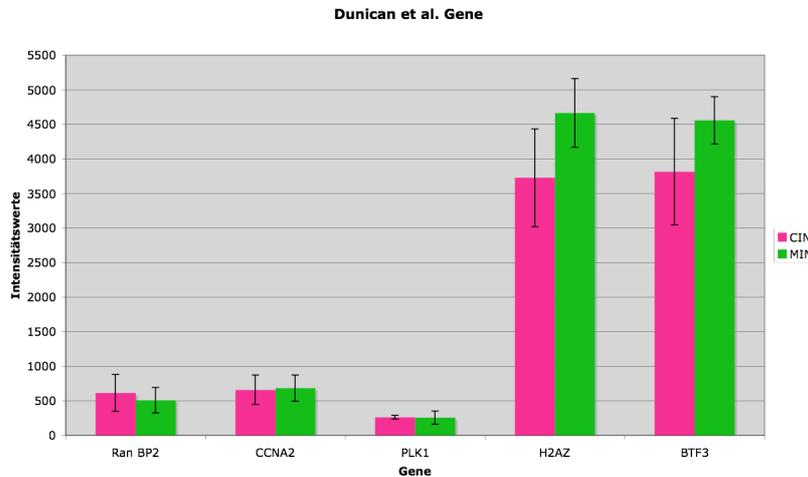


Abb. 3.41: Das Diagramm zeigt die mittleren Intensitätswerte mit Standardabweichungen einiger Gene, die in der Arbeit von Dunican et al. unterschiedlich exprimiert in CIN und MIN vorlagen.

4 Diskussion

In nahezu allen humanen soliden Tumoren wird, neben Mutationen in Tumorsuppressor- und Onkogenen, eine Form der genetischen Instabilität beobachtet. Seit Jahren wird kontrovers diskutiert, ob die genetische Instabilität einen entscheidenden Schritt der frühen Tumorentstehung darstellt, oder ob sie, im Gegensatz hierzu, lediglich ihr Nebenprodukt ist. Die meisten kolorektalen Tumore sind hochgradig aneuploid, das heißt sie weisen massive Gewinne und Verluste von ganzen Chromosomen auf (CIN Tumore). Eine zweite Untergruppe bilden die kolorektalen Tumore mit Defekten im Mismatch Reparatursystem (MIN Tumore). Diese Tumore gelten als chromosomal stabil, sie zeigen jedoch auf Nukleotidebene eine hohe Frequenz von Deletionen und Insertionen, besonders an den Bereichen der repetitiven Mikrosatelliten (Strand et al., 1993). Mikrosatelliteninstabilität kann, wie an Patienten mit dem hereditären nicht polypösen Kolonkarzinom (HNPCC) gezeigt, Krebs auslösen.

Die molekularen Ursachen, sowie die Bedeutung der chromosomalen Instabilität hingegen, stellt die Wissenschaft seit Jahren vor ein Rätsel. Analysen von Tumoren mit Mikrosatelliteninstabilität zeigten, dass der Ausfall eines einzigen Reparaturgens ausreicht, um genetische Instabilität auszulösen, welche das Entstehen von Tumoren fördert (Fishel et al., 1993). Die Vermutung lag nahe, dass auch der Ausfall eines einzigen regulativen Gens ausreichen kann, um chromosomale Instabilität zu verursachen. Neben Checkpointgenen wie hBUB1 oder hMAD2 (Cahill et al., 1998) sind zwei dieser Kandidatengene hCDC4 und hSecurin. Knockoutstudien dieser beiden Gene waren für die Erforschung der Tumorentstehung von großer Bedeutung, da sie die Hypothese untermauerten, dass der Ausfall eines einzigen regulativen Gens eine stabile diploide Zelle in die chromosomale Instabilität zwingen kann. Der Ausfall beider Gene führte in stabilen MIN Tumorzelllinien zu chromosomaler Instabilität, die sich hauptsächlich in chromosomalen Verlusten und Mikronukleusformationen äusserte (Jallepalli et al., 2001; Rajagopalan et al., 2004). Diese Studien bildeten die Grundlage eines, in der vorliegenden Dissertation bearbeiteten, Themenkomplexes. Einige statistische Modelle zur Tumorentstehung basieren auf der Annahme, dass chromosomale Instabilität, ausgelöst durch Mutationen in regulativen "CIN-Genen" ein früher Schritt in der Tumorentwicklung ist, der die Entstehung von Mutationen in Tumorsuppressor- und Onkogenen begünstigt.

Gerade im Hinblick auf diese Fragestellung, war es interessant, die hSecurin und hCDC4 Knockout-Zellsysteme über einen längeren Zeitraum hinweg zu beobachten. Um zu erforschen, ob diese Knockoutzellen den CIN Phänotyp über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten können, oder ob die Zellen Mechanismen besitzen, die sie vor genomischer Instabilität (insbesondere chromosomalen Verlusten) schützen, wurden Langzeitanalysen der beschriebenen Zelllinien hSecurin^{-/-} und hCDC4^{-/-} durchgeführt.

Der zweite Themenkomplex der Doktorarbeit beschäftigte sich mit der Frage, wie Tumorzelllinien mit chromosomaler Instabilität (CIN) sich auf Transkriptionsebene von Tumoren mit Mikrosatelliteninstabilität (MIN) unterscheiden. Durch Genexpressionsanalysen, die an jeweils 5 CIN Zelllinien und 5 MIN Zelllinien durchgeführt wurden, sollten hierbei nicht nur Markergene identifiziert werden, die die beiden Klassen voraussagen, sondern auch neue Hinweise auf Gene gewonnen werden, die möglicherweise einen Einfluss auf die chromosomale Stabilität von kolorektalen Zellen haben.

4.1 Langzeitanalysen der Knockoutzelllinien HCT116 hSecurin^{-/-}, HCT116 hCDC4^{-/-} und DLD1 hCDC4^{-/-}

4.1.1 Analysen der Knockoutzelllinie HCT116 hSecurin^{-/-}

Die MIN Zelllinie HCT116, bei der beide Kopien des zellzyklusregulatorischen Gens hSecurin durch homologe Rekombination ausgeschaltet wurden, zeigte in der Arbeit von Jallepalli et al. ein hohes Maß an chromosomaler Instabilität in Form von massiven chromosomalen Verlusten und seltenen chromosomalen Gewinnen. Dieser Befund wurde durch reduzierte Level und Aktivität des Proteins Separase, welches während der Anaphase die Schwesterchromatiden trennt und einer Regulation durch Securin unterliegt, erklärt (Jallepalli et al., 2001).

Es sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob eine Zelle es schafft zu überleben, wenn sie bei jeder Teilung erneut Chromosomen verliert, oder ob sie, im Gegensatz hierzu, einen Backup Mechanismus entwickelt, der den Securin Verlust ausgleichen kann.

Um diese Fragen zu beantworten wurden steigende Passagen der Knockout und Wildtyp Zelllinie analysiert. Es konnte mittels M-FISH und Interphase-FISH in zwei unabhängigen Ansätzen gezeigt werden, dass HCT116 Zellen, in denen beide

Kopien des hSecurin Gens ausgeschaltet wurden, nur in den ersten untersuchten Passagen chromosomal instabil waren. Bereits nach 8 analysierten Passagen wiesen nahezu alle Zellen wieder den ursprünglichen, stabilen Phänotyp auf und konnten auf chromosomaler Ebene nicht mehr vom Wildtyp unterschieden werden. Mit einem Antikörper gegen Kinetochorproteine gelang es, die Chromatidensegregation der HCT116 Wildtyp- und chromosomal stabilen Knockoutzellen während der Anaphase sichtbar zu machen. Mit dieser Methode sollte geklärt werden, ob chromosomal stabile Zellen ohne Securin immer noch durch ein abnormales Teilungsverhalten gekennzeichnet sind, wie es von Jallepalli et al. beschrieben wurde. Auch in diesen etwas sensitiveren Analysen konnten jedoch keine Unterschiede zwischen beiden Zelllinien gefunden werden. Die Chromatidentrennung fand in chromosomal stabilen Knockoutzellen ohne Segregationsdefekte statt.

Es stellte sich die Frage, was sich in dem kurzen Zeitraum weniger Passagen in den Knockout Zellen abgespielt haben könnte, um eine so drastische Veränderung in Bezug auf die chromosomale Stabilität zu bewirken. In den zunächst beobachteten instabilen Passagen der Zelllinie hSecurin^{-/-} fanden sich kaum chromosomale Gewinne. Eine Zelle, die im (fast) diploiden Zustand in jeder Passage ein oder mehrere Chromosomen verliert, ist womöglich irgendwann an einem Punkt angelangt, wo ihr ein Überleben kaum mehr möglich ist, da beide Kopien ihrer homologen Chromosomen fehlen. Die Zellen jedoch, die den Securin Knockout ohne Segregationsdefekte überstanden hatten, glichen karyotypisch exakt dem Wildtyp. Sie wiesen die gleiche Anzahl an Chromosomen und alle Translokationen auf, die auch in der Ursprungszelllinie beschrieben wurden (z.B. Jallepalli et al., 2001). Es ist zwar nicht ausgeschlossen, dass eine Zelle Monosomien einzelner Chromosomen durch Endoreduplikation rückgängig macht, jedoch ist dies in diesem Fall von massiven chromosomalen Verlusten höchst unwahrscheinlich. Die M-FISH Ergebnisse sprechen vielmehr dafür, dass die karyotypisch stabilen Zellen keine einzige defekte Anaphase durchlaufen hatten. Nach Angaben von Bert Vogelstein, aus dessen Labor die Linien stammten, wurden die Knockoutzellen aus einem einzigen Klon hochgezogen. Das bedeutet, dass die erste Mitose der Knockoutzelle bereits ohne Securin funktioniert haben muss, anderenfalls hätten mit M-FISH Abweichungen vom parentalen Karyotyp festgestellt werden müssen.

Anschließend hat sich die Kultur offensichtlich in Population "D" (diploid) und "A" (aneuploid) aufgespalten, wobei D sich ohne Anaphasendefekte weiterteilte und A

aneuploid wurde (Abb. 4.1). Ein Securin Knockout führte also nicht in 100% der Zellen zu gestörten Anaphasen, sondern vermutlich in einem wesentlich geringeren Prozentsatz, der sich leicht aus den Angaben abschätzen lässt. Vor den, von Jallepalli et al. durchgeführten, FISH Analysen wurden die Knockoutzellen 20 Generationen lang wachsen gelassen. Es ist außerdem davon auszugehen, dass sie vor den Untersuchungen der vorliegenden Dissertation einige weitere Mitosen durchlaufen haben. Aus Tab. 4.1 wird ersichtlich, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auffinden einer karyotypisch normalen Zelle mit steigender Mitosezahl, sowie zunehmendem negativen Effekt eines Securinverlustes rapide abnimmt. Da nach weit über 20 Passagen noch karyotypisch normale Zellen gefunden wurden, ist davon auszugehen, dass der Effekt, den der Securinverlust auf die Schwesterchromatidentrennung ausübt, entweder sehr gering oder nur von kurzer Dauer gewesen sein kann. Darüberhinaus hat Population D die Fähigkeit, in Abwesenheit von Securin eine fehlerfreie Chromatidensegregation durchzuführen, offensichtlich ab einem gewissen Zeitpunkt an ihre Nachkommen weitergegeben, da mit weiter steigender Passagenzahl in der ganzen Kultur keine Abweichungen vom parentalen Karyotyp mehr beobachtet wurden. Die stabilen diploiden Zellen hatten also offensichtlich gegenüber den aneuploiden einen Selektionsvorteil.

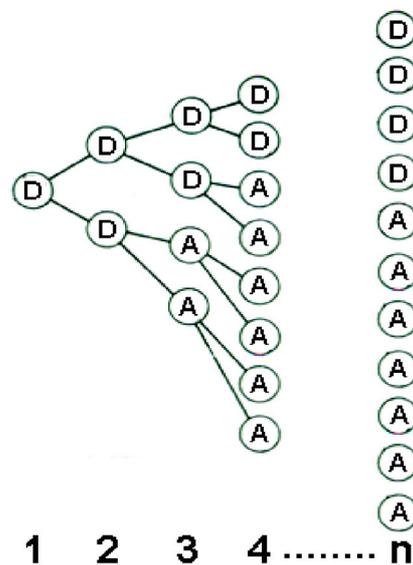


Abb. 4.1: Klonale Expansion einer einzelnen Securin Knockoutzelle. Diploide Zellen werden mit "D" dargestellt, aneuploide Zellen mit "A".

Wahrscheinlichkeit für eine korrekte Segregation in %	Wahrscheinlichkeit für das Auffinden einer diploiden Zelle nach 20 Mitosen	Wahrscheinlichkeit für das Auffinden einer diploiden Zelle nach 100 Mitosen
100%	1	1
99%	0.82	0.36
98%	0.67	0.13
97%	0.54	0.05
96%	0.44	0.02
95%	0.35	0.005
94%	0.29	0.002
93%	0.23	0.0007
92%	0.19	0.0002
91%	0.15	0.00008
90%	0.12	0.00003
80%	0.01	0.0000000002
60%	0,00004	6×10^{-23}
40%	0,00000001	2×10^{-40}
20%	0,00000000000001	1×10^{-70}
10%	1×10^{-20}	1×10^{-100}

Tab. 4.1: Die Konsequenz aus einer durch Securin erniedrigten Wahrscheinlichkeit für eine korrekte Chromatidensegregation nach 20 und 100 Zellteilungen.

Es gibt in der Biologie das seltene Phänomen der "Pseudoreversion".

Pseudoreversion beschreibt eine Rückkehr zum normalen, bzw. ursprünglichen Phänotyp, ohne dass sich am betroffenen Genprodukt (in diesem Falle Securin) etwas ändert. Pseudoreversion wurde bisher hauptsächlich bei Viren und Hefen beobachtet (z.B. Maciaszczyk et al., 2004), jedoch nur in Einzelfällen bei humanen Zellen nachgewiesen (z.B. Rhee et al., 2002). Es ist vorstellbar, dass die in Securin Knockoutzellen aufgetretene Pseudoreversion durch Mutationen in regulativen Genen stattgefunden hat, welche den Securinverlust ausgleichen konnten und den Zellen eine normale Anaphase ermöglichten. Da allerdings die Analysen zweimal unabhängig voneinander mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt wurden, ist es eher unwahrscheinlich, dass Pseudoreversion durch zufällige Mutationen verursacht wurde. Epigenetische oder andere regulative Mechanismen kommen daher als Ursachen der Pseudoreversion eher in Frage.

Wichtig war nun, herauszufinden, ob die Pseudoreversion über einen Anstieg in Separaselevel und -aktivität funktionierte, was die plausibelste Erklärung der Befunde gewesen wäre. Die Westernblots, welche hierzu durchgeführt wurden, zeigten jedoch eindeutig, dass Separase in chromosomal stabilen Knockout Zellen immer noch in weitaus geringerer Konzentration vorlag und dass diese Separase

nicht fähig war, SCC1 mit der gleichen Effektivität zu schneiden, wie in Wildtyp Zellen. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass stabile Securin Knockoutzellen immer noch die selben biochemischen Defekte aufwiesen, die von Jallepalli et al. für die chromosomale Instabilität verantwortlich gemacht wurden. Trotzdem waren diese Zellen stabil, die Cohesinspaltung durch Separase musste also einwandfrei funktioniert haben. Separase Knockout Mäuse sind nicht lebensfähig (Wirth et al., 2006) weshalb angenommen werden kann, dass es in Säugerzellen wohl keinen Ersatz für das Protein Separase gibt. Die Schlussfolgerung, die mit diesem Wissen aus den Analysen gezogen werden kann, ist, dass eine funktionierende Cohesinspaltung mit weitaus weniger Separase möglich ist, als in Normalzellen vorliegt. Eine Studie, in der gezeigt wurde, dass Separase in der Lage ist, selbst das Cohesin entlang der Chromatidenarme zu entfernen wenn Plk1 ausfällt, unterstützt diese These (Gimenez-Abian et al., 2005).

Der Westernblot vor und nach Zugabe von Anaphasenextrakt gab außerdem Anlass zu der Annahme, dass in Securin Knockout Zellen die Separase Selbstspaltung dereguliert ist, beziehungsweise zellzyklusunabhängig stattfindet. Dieser Befund war überraschend, da Separase in normalen Zellen vor der Anaphase zusätzlich zur Securin-Regulation auch durch CDK1 gehemmt wird. Es ist durchaus möglich, dass die initial beobachtete CIN ein Resultat dieser deregulierten Separase-Selbstspaltung gewesen ist und nicht, wie von Jallepalli et al. vermutet, durch die reduzierte Separase Aktivität bedingt war. Da die Zellen ab der achten untersuchten Passage chromosomal stabil waren, fand in ihnen trotz deregulierter Selbstspaltung jedoch mit Sicherheit keine verfrühte Cohesinspaltung statt. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das Protein Separase keine direkte Rolle bei der Pseudoreversion von Securin Knockoutzellen gespielt hat.

Möglich ist, dass Zellen den Verlust eines regulativen Gens wie Securin innerhalb kurzer Zeit registrieren und mit dem Anschalten eines Backup Mechanismus reagieren, der durch die Hoch- bzw Runterregulierung zellzyklusspezifischer Gene funktionieren könnte. Backup Systeme machen gerade bei essentiellen Ereignisse wie der Chromatidentrennung nicht nur Sinn, sondern wurden auch mehrfach beschrieben. Hefezellen beispielsweise, denen sowohl Securin als auch der Anaphase Promoting Complex (APC) fehlt, sind sogar in der Lage, auf Nocodazol Behandlung zu reagieren, indem sie einen G2/M Arrest induzieren, was für einen zusätzlichen Spindel Checkpoint, zumindest im Hefesystem, spricht (Andrews et al., 2005). Bereits diskutiert wurde die doppelte Regulation von Separase durch Securin

und CDK1 (Stemmann et al., 2001). Seit kurzer Zeit ist darüber hinaus bekannt, dass zentromerisches Cohesin bis zum Beginn der Anaphase durch das Protein Shugoshin (Sgo1) geschützt wird, um nicht verfrüht von Separase gespalten zu werden (Salic et al., 2004; Tang et al., 2004; McGuinness et al., 2005).

Potentielle Backup Mechanismen können sich am Expressionsmuster der Zelle bemerkbar machen. Aus diesem Grund wurden Expressionsanalysen durchgeführt. Idealerweise hätten vergleichende Genexpressionsanalysen von frühen Passagen, in denen noch die Mehrzahl aller Zellen Segregationsdefekte aufwiesen, und chromosomal stabilen Securin Zellen durchgeführt werden müssen, um die Unterschiede zu finden, die dem stabilisierenden Effekt zu Grunde liegen. Leider konnte jedoch in Knockoutzellen, die zum frühestmöglichen Zeitpunkt eingefroren wurden, nach dem Auftauen keine Instabilität mehr beobachtet werden. So war es nicht mehr möglich, das Transkriptom von chromosomal instabilen und stabilen Securin Knockoutzellen zu vergleichen.

Um jedoch erste Anhaltspunkte für Backup Systeme zu erlangen, wurden vergleichende Genexpressionsanalysen verschiedener Passagen der Wildtyp- und Knockout Zelllinie durchgeführt. Zunächst fiel hierbei auf, dass zwischen den beiden Zelllinien kein signifikanter Unterschied in der Expression des CDK1 Gens vorlag. Die chromosomale Stabilität in Securin Knockoutzellen war also offensichtlich nicht durch erhöhte CDK1 Level bedingt. Es wäre interessant gewesen, Intensitätswerte beider Zelllinien für das Cohesin-schützende Protein Shugoshin zu vergleichen, jedoch ist dieses Gen noch nicht durch Oligos auf dem HG U133 Chip repräsentiert. Auch kommerzielle Antikörper sind derzeit nicht erhältlich. Somit ist nicht auszuschließen, dass Shugoshin sich stabilisierend auf das Genom von Securin Knockoutzellen höherer Passagen ausgewirkt hat. Dieser Aspekt soll in weiterführenden Studien untersucht werden. Anhand der Expressionswerte konnte ausgeschlossen werden, dass die Securin Pseudogene PTTG2 und PTTG3 in Abwesenheit von Securin dessen Funktion übernehmen, wie von Mei und Kollegen vorgeschlagen hatten (Mei et al., 2001).

Auffallend und interessant war die Hochregulierung von Polo-like Kinase 2 (Plk2) um den Faktor 2,5 in Securin Knockoutzellen. Polo-like Kinasen haben regulatorische Funktionen in verschiedenen Zellzyklusstadien und interagieren mit mitotischen Strukturen wie Kinetochoren (Plk1), Centrosomen (Plk2) und Komponenten der Spindel (Barr et al., 2004). Es ist bekannt, dass Securin mit p53 interagiert und durch

eine Blockierung der DNA Bindungsstelle dessen aktivierende Funktion negativ beeinflusst (Bernal et al., 2002).

Das Protein Tp53 wiederum induziert bei mitotischem Stress die Expression von Plk2 (Burns et al 2003). Möglicherweise hat also der mitotische Stress, den der Knockout von Securin in der Zelle ausgelöst hat, über die fehlende Inhibierung von p53, zu einem Anstieg in der Plk2 Expression geführt. Dieser Expressionsanstieg könnte sich stabilisierend auf das Genom der Knockoutzellen ausgewirkt haben.

Um diesen Aspekt genauer zu untersuchen, wurden siRNA Experimente durchgeführt, um Plk2 in Knockout und Wildtyp Zellen herunterzuregulieren. Falls die Plk2 Überexpression tatsächlich der entscheidende Stabilitätsfaktor gewesen ist, wäre zu erwarten gewesen, dass Knockoutzellen ohne Plk2 ein erhöhtes Maß aneuploider Zellen aufweisen. Es wurden jedoch mit Interphase FISH Analysen nach 24, 48 und 72 Stunden keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Plk2 Knockdown Zellen beobachtet.

Es könnte zusätzliche Mechanismen gegeben haben, die die genomische Integrität bei einem Ausfall von Securin schützen.

Durch die Expressionsanalysen wurden neben Plk2 auch zwei weitere Gene identifiziert, deren Produkte im Zusammenhang mit der Chromatidensegregation stehen. RCC1 ist ein "Ran-GTP exchange factor", welcher während der Mitose an kondensierten Chromosomen nachgewiesen wurde (Ohtsubo et al., 1989) und dort eine hohe Konzentration von Ran GTP generiert (Bischoff et al., 1991).

Die Konzentration von Ran-GTP während der Mitose ist entscheidend für den Aufbau der Spindel und den korrekten Ablauf der Chromatidensegregation (Li & Zheng, 2004).

In den Expressionsexperimenten der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Securin Knockoutzellen eine niedrigere RCC1 Expression aufweisen. Dieser Befund ist insofern interessant, da leicht erhöhte RCC1 Konzentrationen in Versuchen an *Xenopus* den Spindel Checkpoint übergehen und zu Segregationsdefekten führen (Arnaoutov & Dasso, 2003). Im Securin Knockout Zellsystem könnte die Down-Regulation von RCC1 sich stabilisierend auf den Meta-/Anaphasenübergang ausgewirkt haben.

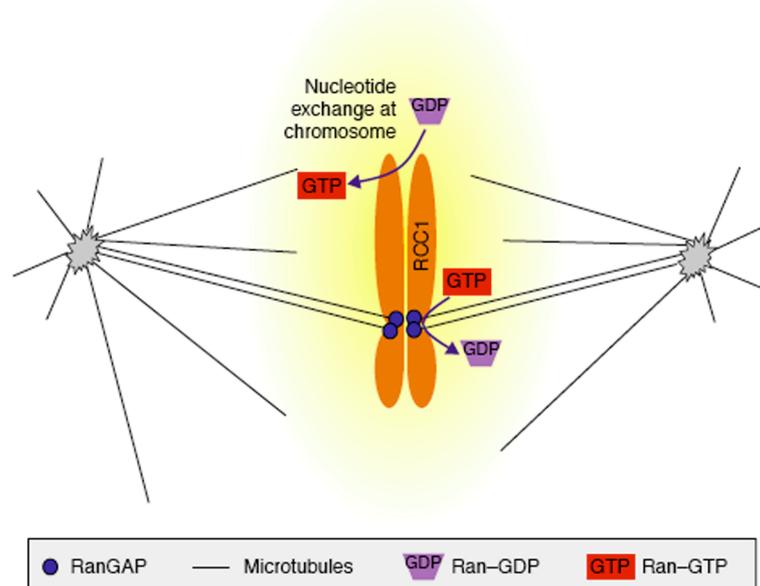


Abb. 4.2: RCC1 lokalisiert an mitotischen Chromosomen und bildet einen hohen Gradienten an Ran-GTP (Quimby et al., Current Opinion in Cell Biology, 2003).

Die Expressionsanalysen zeigten darüber hinaus eine niedrigere Expression des Gens für SMC6 in Securin Knockout Zellen. Komponenten der "Structural Maintenance of Chromosome" (SMC) Proteinfamilie vernetzen Chromatin und tragen dadurch zur Erhaltung der Chromosomenstruktur bei (Kireeva et al. 2004). Kürzlich wurde außerdem gezeigt, dass SMC6 Mutanten ein abnormales Teilungsverhalten aufweisen und Telomer Repeats, sowie repetitive Regionen, die für ribosomale RNA codieren, nicht korrekt segregieren (Torres-Rosell et al., 2005).

Auch die Down-Regulation von SMC6 könnte also einen stabilisierenden Effekt auf die Knockout Zellen ausgeübt haben. Um solche Effekt nachzuweisen, wäre es allerdings notwendig, die Genprodukte von RCC1 und SMC6 in Securin-/- Zellen mit Expressionsvektoren wieder auf das Wildtyp Maß zurück zu bringen und zu testen, ob dies in einer erhöhten Anzahl aneuploider Zellen resultieren würde. Diese Experimente konnten im Zuge der Dissertation nicht durchgeführt werden, bilden jedoch eine Basis für mögliche weiterführende Studien.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass eine Deletion im Securingen alleine nur einen sehr geringen negativen Einfluss auf die Stabilität des Genoms ausübt. Darüberhinaus wurde nachgewiesen, dass, wahrscheinlich bereits zu einem frühen Zeitpunkt eine Pseudoreversion stattgefunden hat, die den Knockoutzellen eine normal funktionierende Anaphase ohne Securin ermöglichte. Diese Pseudoreversion funktionierte möglicherweise durch das Anschalten von Backup Mechanismen, die die genomische Integrität im Falle eines Securinverlustes schützen.

Eine andere Interpretationsmöglichkeit der Befunde wäre, dass die zunächst beobachtete Instabilität in Securin Knockoutzellen durch den Deletionsprozess an sich zustande kam, und somit artifiziell bedingt war. In beiden Fällen wäre Securin kein unersetzliches Gen für die Erhaltung der chromosomalen Stabilität. Hierfür würde sprechen, dass Mäuse, denen beide Kopien des Securingens fehlen, lebensfähig und fertil sind und ihre Zellen einen normalen Spindelcheckpoint aufweisen (Mei et al., 2001). Die selbe Gruppe berichtete allerdings von embryonalen Mausstammzellen, die ohne Securin in 20% chromosomale Gewinne und Verluste zeigen (Huang, 2005). Es muss in dieser Beziehung zwischen Mensch und Maus Unterschiede geben, da Mauszellen ohne Securin ein nahezu normales Level an Separase aufweisen, was bei menschlichen Zellen nachweislich nicht der Fall ist.

4.1.2 Analysen der Knockout Linien HCT116 hCDC4^{-/-} und DLD1 hCDC4^{-/-}

Ein Ausschalten des Gens für hCDC4 in den Zelllinien HCT116 und DLD1 führte in der Arbeit von Rajagopalan et al. zu einer erhöhten Anzahl aneuploider Zellen und einem Anstieg von Mikronukleusformationen von 0,9 - 1% im Wildtyp auf 18 - 22% der Knockoutzellen (Rajagopalan et al., 2004). Diese Arbeit unterstützte die Theorie, nach der der Ausfall eines einzigen wichtigen Genes in einer diploiden Zelle chromosomale Instabilität auslösen kann. Da die Analysen der Securin^{-/-} Zellen jedoch zeigten, dass der Knockout allenfalls zu einem zeitlich sehr begrenzten Anstieg der chromosomalen Instabilität führte und wahrscheinlich redundante Systeme aktiviert, schien es interessant auch das CDC4 Knockout System erneut zu analysieren. Durch diese Analysen sollten ebenso wie beim Securin System getestet werden, ob die chromosomale Instabilität über längere Zeit aufrecht erhalten bleiben kann und ermittelt werden, ob Pseudoreversion durch redundante Systeme ein allgemeineres Phänomen ist.

Mit Interphase FISH konnte gezeigt werden, dass bereits in den ersten untersuchten Passagen nach dem Auftauen in HCT116 hCDC4^{-/-} keine signifikant erhöhte Aneuploidenrate im Vergleich zur Wildtyp Zelle vorlag. Ein etwas sensitiveres Verfahren als die Interphase-FISH Auswertung für die Erfassung der chromosomalen Instabilität ist die Visualisierung der Chromatidensegregation (wie sie bei Securin Knockout- und Wildtypzellen durchgeführt wurde) oder die Auszählung von Mikronuklei. In den CDC4 Analysen wurden aus diesem Grund Mikronuklei ausgezählt. Auch bei diesen Auszählungen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen HCT116 Wildtyp und HCT116 hCDC4 Knockout festgestellt werden. Es

konnte also davon ausgegangen werden, dass sich auch in diesem Zellsystem ein oder mehrere chromosomal stabile Knockoutklone durchgesetzt hatten. Um herauszufinden, ob die stabilen Knockoutklone einen normalen diploiden Karyotyp aufweisen, wurden die Zelllinien HCT116 und HCT116 hCDC4^{-/-} mit M-FISH karyotypisiert. Interessanterweise fand sich, wie im Fall von Securin auch in der chromosomal stabilen Knockoutzelllinie kein Verlust von ganzen Chromosomen. Es hatte sich also auch hier ein nahezu diploider Klon gegen alle aneuploiden Klone durchgesetzt. Im Gegensatz zum Wildtyp konnte in HCT116 hCDC4 Knockoutzellen ein Y-Chromosom gefunden werden. Es wird in der Literatur berichtet, dass die Zelllinie HCT116 heterogen ist und in einem geringen Prozentsatz Y-Chromosomen aufweist. In der parentalen Linie wurde dieser Klon nie gefunden. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass der hCDC4 Knockout zufällig eine solche Zelle getroffen hat. Darüber hinaus wurde in allen untersuchten Metaphasen der HCT116 Knockoutzelllinie ein neuer komplexer struktureller Umbau beobachtet, der in der Parent-Zelllinie noch nicht vorhanden war. Ob dieser Umbau der HCT116 Zelllinie möglicherweise einen Selektionsvorteil dieses Klons bedeutete bzw. eine Auswirkung auf die Pseudoreversion der Zelllinie HCT116 hCDC4^{-/-} gehabt hat, konnte im Rahmen der Dissertation nicht geklärt werden.

Die Analysen der Zelllinie DLD1 hCDC4^{-/-} Analysen lieferten ein etwas anderes Bild. Während keine signifikante Erhöhung der Anzahl aneuploider Zellen mit Interphase-FISH festgestellt werden konnte, zeigten die DLD1 hCDC4 Knockoutzellen eine Zunahme der Mikronuklei von ca 1,5% (Wildtyp) auf ca 3%. Die Prozentzahlen der Mikronuklei für die DLD1 Knockoutlinie lagen somit zwar erstaunlicherweise noch unter denen des HCT116 Wildtyps (4 - 4,5%) und weit unter den bei Rajagopalan et al. angegebenen Prozentzahlen (22%), aber innerhalb des DLD1 Systems konnte eine Erhöhung der Instabilität festgestellt werden. Anhand der Interphase-FISH Daten und den Bänderungsanalysen kann einerseits zwar davon ausgegangen werden, dass auch ein Großteil der DLD1 hCDC4 Knockoutzellen sich im Laufe der Zeit an das Fehlen von CDC4 angepasst und stabil geblieben ist, andererseits hat sich der stabile Klon wohl in diesem System nicht vollständig gegen den instabilen Klon durchgesetzt. Es ist bekannt, dass die MIN Zelllinie DLD1 kein funktionsfähiges "Adenomatosis polyposis coli" (APC) Gen besitzt. Wie beschrieben, wurde nachgewiesen, dass APC Mutationen chromosomale Instabilität auslösen können (z.B Green et al., 2005). Es ist vorstellbar, dass das Fehlen von APC zusätzlich zum hCDC4 Knockout einen destabilisierenden Einfluss auf einen Teil der Zellen ausgeübt hat, jedoch ist ein solcher Einfluss eines Modifier Gens nur spekulativ.

Insgesamt bleibt auch die Frage offen, ab wann wirklich eine Instabilität vorliegt, und ab wann diese eine biologische Signifikanz hat. Im Falle der DLD1-Zelllinie konnte ein möglicher Anstieg der chromosomalen Instabilität nicht durch Interphase-FISH (auch dies im Gegensatz zur Arbeit von Rajagopalan et al.) sondern nur über die Mikronuklei nachgewiesen werden. Darüber, ob eine solch geringe Änderung tatsächlich die Tumorzinzidenz beeinflussen kann, kann nur spekuliert werden.

Bei der Securin Knockout Linie konnte in etwa nachvollzogen werden, wann pseudorevertierte Zellen sich gegen die aneuploiden Klone durchsetzen konnten. Dies war bei hCDC4 Knockoutzellen nicht möglich. Um zu erforschen, wann und wie Pseudoreversion in hCDC4 Knockoutzellen tatsächlich stattfindet, wäre es nötig, einzelne instabile Zellen wachsen zu lassen und zu beobachten, welche Klone schneller wachsen und welche stabil werden. Auch vergleichende Genexpressionsanalysen von hCDC4 Wildtyp und Knockoutzelllinie wären für diese Fragestellung interessant.

4.1.3 Relevanz der Analysen an den Knockoutsystemen von hSecurin und hCDC4 und mögliche weiterführende Studien

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass der Ausfall von hCDC4 und hSecurin in MIN Zellen initial wohl nur in einer geringen Anzahl der Zellen zu chromosomaler Instabilität führte. Ein Teil der Zellen kam nachweislich gut mit dem Knockout zurecht und blieb durch alle Passagen hinweg stabil. Die präsentierten Daten von Securin sprechen außerdem dafür, dass der Ausfall eines einzelnen regulativen Gens, im Zuge der Pseudoreversion Backup Mechanismen anschalten kann, die solch essentielle Vorgänge wie die Anaphase schützen.

Dieses Ergebnis stellt die tatsächliche Bedeutung der "CIN-Gene" hSecurin und hCDC4 für die frühe Tumorentwicklung in Frage.

Für das Verständnis der Krebsentstehung wäre es nun wichtig, zu wissen, ob normale (nicht-Tumor-) Zellen auf einen Knockout in hCDC4 oder hSecurin, genauso reagieren, wie der Großteil der untersuchten Knockoutzellen, und sich auch hier ein Backup Mechanismus anschaltet, bevor ein geringer Anteil aneuploider Zellen entarten und Mutationen in Tumorsuppressor und Onkogenen begünstigen kann. Es gibt jedoch gegenwärtig keine Vergleichsmöglichkeiten mit CDC4 oder Securin Knockouts in normalen humanen Zellen. Es ist möglich, dass gerade in MIN-Tumorzelllinien eine zusätzliche CIN zuviel Instabilität darstellt und sich deshalb Pseudoreversion durch Mutationen oder Backup Mechanismen schneller entwickeln

kann. Andererseits ist es auch vorstellbar, dass in normalen humanen Zellen Knockouts der Gene hSecurin und hCDC4 überhaupt nicht zu Aneuploidien führen, oder dass einzelne aneuploide Zellen effektiver eliminiert werden, als in MIN Zelllinien. Darüberhinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass Modifizergene in den verwendeten Zelllinien eine Rolle gespielt haben. Wie die Ergebnisse zeigten, konnte beispielsweise in der Knockoutlinie DLD1 hCDC4^{-/-} im Gegensatz zur HCT116 hCDC4^{-/-} Zelllinie noch eine leicht erhöhte Anzahl an Mikronuklei festgestellt werden.

Die Beobachtung, dass ein Securin oder CDC4 Knockout offenbar schon in der ersten Zelle nicht zu Mitosedefekten führt, lässt sich nicht durch die hohe Mutationsrate von MIN Zellen erklären. Auch die Tatsache, dass der Effekt zweimal unabhängig voneinander beobachtet wurde, spricht gegen eine zufällige Mutation. Vergleiche mit Knockoutmäusen lassen darüberhinaus den Schluss zu, dass Securin tatsächlich kein essentielles Gen für die chromosomale Stabilität ist.

Es ist also wahrscheinlich, dass ein Ausfall eines dieser beiden Gene auch in normalen Zellen redundante Systeme aktiviert und nur in einem geringen Prozentsatz zu chromosomaler Instabilität führt, somit also für die frühe Tumorentstehung eher unbedeutend ist. In den Arbeiten von Jallepalli et al. und Rajagopalan et al. wurden die Gene hCDC4 und hSecurin für Knockout Experimente ausgewählt, weil sie in Tumoren häufig in mutierter Form vorliegen und, von ihrer Funktion her, gute Kandidaten für ein "CIN-Gen" abgaben. Securindeletionen oder verringerte Expressionslevel wurden bisher jedoch nie in Tumoren beschrieben, wohingegen eine Überexpression relativ häufig beobachtet wurde (Pei & Melmed, 1997; Boelaert et al., 2003). Dies spricht ebenfalls dafür, dass der Ausfall von Securin kein wichtiger Schritt für die chromosomale Instabilität in der (frühen) Tumorentstehung ist. Auch die Bedeutung der Ergebnisse von Rajagopalan et al. für das Gen hCDC4 wurde mittlerweile relativiert. Kemp et al. konnten in 244 untersuchten kolorektalen Tumoren keine biallelische Mutation des hCDC4 Gens nachweisen. In 6% der Fälle wurden lediglich monoallelische Mutationen dieses Gens gefunden, die außerdem nicht mit dem Auftreten von chromosomaler Instabilität korrelierten (Kemp et al., 2005). Darüberhinaus konnte an Mauszellen gezeigt werden, dass ein hCDC4 Ausfall nicht zwingend mit einer erhöhten Cyclin E Expression einhergeht, wodurch ein Zusammenhang des hCDC4 Gens und der chromosomale Instabilität in Tumoren weiter in Frage gestellt wird (Mao et al., 2004).

Im Zusammenhang mit der frühen Tumorentwicklung ist auch eine andere Beobachtung, die während der Langzeitanalysen von hCDC4 und hSecurin

Knockoutzellen gemacht wurde, interessant. Die Mehrzahl aller aggressiven humanen CIN Tumore weist einen hyperdiploiden Chromosomensatz auf. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass aneuploide Tumorzellen eher aus tetraploiden Vorläuferzellen entstehen, als aus diploiden. Eine Gemeinsamkeit von hCDC4 -/- und hSecurin-/- Zellen war jedoch, dass die frühen Passagen hauptsächlich Mikronukleusformationen und chromosomale Verlusten aufwiesen. Eine Erhöhung der Anzahl tetraploider Zellen wurde in den Knockoutzellen nicht beobachtet. Chromosomal instabile Nachkommen diploider Zellen mit Mikronukleusformationen sind womöglich weniger relevant für die Entstehung von Tumoren, da sie einen Selektionsnachteil darstellen. Für einen Selektionsnachteil aneuploider Klone spricht auch, dass sich in beiden Zelllinien letztendlich ein stabiler Klon durchgesetzt hat, der nahezu diploid war.

Andere "CIN-Gene", die als vielversprechende Kandidaten für die Entstehung von CIN in Tumoren gelten, weil sie tatsächlich in einem kleinen Anteil epithelialer Tumoren inaktivierende Mutationen aufweisen, sind die Checkpointgene BUB1 und BUBR1. BUB1 Knockouts führen in humanen Fibroblasten Linien zu Aneuploidien (Musio et al., 2003). Eine erhöhte chromosomale Instabilität in den zwei BUB1-defekten Tumorzelllinien VACO-40 und VACO-42, wie sie von Lengauer et al. beobachtet wurde (Lengauer et al., 1997), konnte jedoch von einer anderen Gruppe nicht bestätigt werden (Grigorova et al., 2004). Diese Gruppe analysierte diese Zelllinien mit M-FISH und konnte lediglich einen stabilen nahezu tetraploiden Karyotyp feststellen. Diese Diskrepanz weist weiter darauf hin, dass der Ausfall eines "CIN-Gens" auch in einer nicht-MIN Zelllinie nicht zwingend mit chromosomaler Instabilität einhergeht. Es ist möglich, dass sich auch bei diesen Zellen im Zuge der Pseudoreversion inzwischen Schutzmechanismen ausgebildet haben, die unter bestimmten Umständen die chromosomale Instabilität umgehen können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen die Wichtigkeit, solche Mechanismen zu identifizieren und genauer zu untersuchen. Funktionelle Rückschlüsse, die aus den Analysen der Doktorarbeit gezogen werden konnten, gelten mit hoher Wahrscheinlichkeit auch für normale humane Zellen. Interessant ist in diesem Zusammenhang beispielsweise die biochemische Untersuchung von Separase. Der Defekt in der Separaseaktivität, der von Jallepalli für den CIN Phänotyp verantwortlich gemacht wurde, erwies sich als irrelevant für die Entstehung der chromosomalen Instabilität. Auch die aus den Genexpressionsanalysen gewonnenen Hinweise auf Gene, die einen Beitrag zur

chromosomalen Stabilität in Securin Knockoutzellen geleistet haben könnten, sind für die Erforschung von regulativen Vorgängen während der Zellteilung hochinteressant. Es ist für das Verständnis von Tumoren und für mögliche therapeutische Ansätze von großer Bedeutung, zu erforschen, welche Möglichkeiten eine Zelle besitzt, ihr Genom vor Instabilität zu bewahren.

4.2 Vergleichende Genexpressionsanalysen zwischen kolorektalen CIN und MIN Zelllinien und siRNA Analysen

In den vorangegangenen Kapiteln wurde auf die Schwierigkeit hingewiesen, eine eindeutige Aussage über Gene zu treffen, die an der Entstehung der chromosomalen Instabilität in Tumoren beteiligt sind. Nicht nur redundante Systeme spielen möglicherweise eine bisher unterschätzte Rolle, auch der Einfluss von möglichen Modifier Genen kann bei solchen Knockoutversuchen nicht ausgeschlossen werden. Ausserdem sollten Gene, deren Produkte bei der Entstehung der chromosomalen Instabilität in Tumoren eine wichtige Rolle spielen, auch tatsächlich in Tumorzellen in veränderter Form gefunden werden. Es erscheint daher sinnvoll, sich bei der Suche nach Faktoren, die CIN auslösen, chromosomal instabile Tumore mit chromosomal stabilen Zellen zu vergleichen. Ein Expressionsvergleich zwischen Tumoren mit Mikrosatelliteninstabilität und chromosomaler Instabilität bietet sich hierfür aus verschiedenen Gründen an. Es scheint, als würden CIN und MIN sich, zumindest im Zellliniensystem, gegenseitig ausschließen. Es gibt nur eine verschwindend geringe Anzahl an Tumorzelllinien, die beide Formen der genetischen Instabilität zeigen. Trotz der Vielzahl an Veränderungen auf Nukleotidebene, welche in Tumoren mit Mismatch Reparaturdefekten auftreten, sind diese auf chromosomaler Ebene stabil und weisen meist einen fast diploiden Karyotyp auf. Anders herum wurde in aneuploiden Tumoren so gut wie nie Mikrosatelliteninstabilität beobachtet (Lengauer et al., 1997). Zudem wurde gezeigt, dass binukleäre Zellen, die aus einer Fusion zwischen zwei MIN Zellen entstanden sind, chromosomal stabil bleiben (Lengauer et al., 1997). Es liegt also die Vermutung nahe, dass in MIN Zelllinien der entscheidende Faktor für die Entstehung der chromosomalen Instabilität nicht vorhanden ist, oder aber diese Zellen ihr Genom auf bisher unbekannte Weise stabil halten. Offenbar gibt es grundlegende Unterschiede, welche diese beiden Klassen der Kolonkarzinomzelllinien charakterisieren.

Um zu untersuchen, ob sich diese Unterschiede auf Transkriptionsebene bemerkbar machen, wurden, unter Verwendung des Affymetrix HG U133 Chips, in der vorliegenden Dissertation vergleichende Genexpressionsanalysen zwischen 5 kolorektalen MIN Tumorzelllinien und 5 kolorektalen CIN Tumorzelllinien durchgeführt. Ein Anliegen hierbei war, mögliche Kandidatengene zu finden, die an der Erhaltung der chromosomalen Stabilität beteiligt sind oder die CIN verursachen können. Diese sollten in CIN und MIN Tumoren beider Klassen deutlich unterschiedlich exprimiert sein. Unter Verwendung der beschriebenen statistischen Algorithmen wurden die signifikant unterschiedlich exprimierten Gene ermittelt.

Vergleichende Genexpressionsanalysen von CIN und MIN Zelllinien wurden in der Vergangenheit bereits von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt. Zunächst sollen daher die, in der vorliegenden Dissertation gewonnenen Daten mit den Ergebnissen älterer Studien verglichen werden. Anschließend werden einige Genprodukte diskutiert, die in den durchgeführten Expressionsvergleichen signifikant unterschiedlich in CIN und MIN Zelllinien vorlagen und wegen ihren Funktionen als interessant im Zusammenhang mit der chromosomalen Instabilität befunden wurden.

4.2.1 Vergleiche der Expressionsergebnisse mit Daten anderer Arbeiten

Dunican et al. verglichen die Expression von MIN und CIN Zellen mit dem Gene Discovery Array (GDA) v1.3. Sie berichteten von 6 interessanten unterschiedlich exprimierten Genen, welche in Zusammenhang mit der chromosomalen Stabilität stehen könnten (Dunican et al., 2002). In der vorliegenden Doktorarbeit wurden die Expressionswerte dieser 6 Gene daher noch einmal mit den Daten von Dunican et al. verglichen. Für die Gene H2AZ und BTF3 konnte eine tendenziell erhöhte Expression in MIN Zellen bestätigt werden, jedoch überschneiden sich die Verteilungen stark, weshalb diese Gene in der vorliegenden Arbeit nicht als signifikant unterschiedlich exprimiert eingestuft wurden. Über das Gen PTPD konnte keine Aussage getroffen werden, da es auf dem HG U133 Chip nicht repräsentiert wird. Es konnten jedoch zwischen CIN und MIN Zelllinien keine Expressionsunterschiede für die Gene RanBP2, CCNA2 und Plk1 bestätigt werden.

In einer etwas neueren Arbeit analysierten Giacomini et al. das Transkriptom eines Sets von insgesamt 13 CIN und MIN Linien (Giacomini et al., 2005). Sie fanden, dass einige Genprodukte des Metallothioneinstoffwechselweges in MIN Zellen deutlich überexprimiert vorliegen. Metallothioneine sind kleine Metall-bindende Proteine, die einen Schutz vor alkylierenden Substanzen und anderen

antineoplastischen Verbindungen bieten. Giacomini et al. spekulierten über eine mögliche Resistenzwirkung der Metallothioneinproteine gegen Chemotherapeutika, da MIN Tumore im Allgemeinen schlechter auf diese Behandlungen ansprechen. Obwohl in der vorliegenden Arbeit für die Metallothioneingene teilweise große Standardabweichungen ermittelt wurden, konnte eine Überexpression in MIN Zellen bestätigt werden.

4.2.2 Diskussion der Expressionsdaten

Die Analysen der vorliegenden Arbeit ergaben eine signifikant unterschiedliche Expression einer großen Anzahl von Genen in CIN und MIN Zelllinien. Um Hinweise auf neue Kandidatengene zu finden, die eine Rolle bei der Erhaltung der chromosomalen Stabilität spielen, wurde in verschiedenen Datenbanken, nach den Funktionen der hochsignifikant unterschiedlich exprimierten Gene gesucht. Einige der interessanten Gene ließen sich aufgrund ihrer Funktion in verschiedene Gruppen einteilen (Tab. 4.2).

Wie bereits beschrieben, weisen sowohl MIN als auch CIN Zellen Störungen des APC/Wnt Signalweges auf. Im Allgemeinen kommen in MIN Tumoren häufiger CTNNB1 Mutationen vor, wohingegen CIN Tumore eher ein mutiertes APC Gen aufweisen. Auf die untersuchten Zelllinien trafen diese Charakteristika jedoch nur bedingt zu, wie Tab. 4.3 verdeutlicht.

	Genprodukte	Expression in CIN Zellen
Ran-assoziierte Proteine	NTF2	↓
	RanBP6	↓
	Nup50	↓
APC-assoziierte Proteine	CTNNB1	↓
	EB1	↑
Centrosomen- / Mikrotubuli-bindende Proteine	MARK4	↓

Tab. 4.2: Einteilung der in CIN und MIN unterschiedlich exprimierten Gene in funktionelle Gruppen

Zelllinie	Herkunft	APC Status	CTNNB1 Mut	MSI
HCT116	Kolon	wt	mut	+
SW48	Kolon	wt	mut	+
LOVO	Kolon	mut	wt	+
DLD1	Kolon	mut	wt	+
RKO	Kolon	wt	wt	+
HT29	Kolon	mut	wt	-
SW480	Kolon	mut	wt	-
Caco2	Kolon	mut	mut	-
SW403	Kolon	mut	wt	-
SW837	Rektum	mut	wt	-

Tab. 4.3: Merkmale der, für die Genexpressionsanalysen verwendeten, kolorektalen Zelllinien.

Dennoch wurden signifikante Unterschiede im Expressionsmuster von APC-assoziierten Genen gefunden. Catenin β zeigte eine etwa doppelt so hohe Expression in MIN Zellen. Besonders interessant im Zusammenhang mit der chromosomalen Stabilität war die in CIN Zellen erhöhte Expression des EB1 Gens um den Faktor 2. EB1 (MAPRE1) ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, welches direkt mit dem "Adenomatosis polyposis coli" Genprodukt (APC) interagiert. Es wurde nachgewiesen, dass die Konzentration des EB1 Proteins ein kritischer Faktor für die Stabilität des Genoms ist. Mit siRNA Analysen wurde gezeigt, dass verminderte EB1 Level zu drastisch reduzierten astralen Mikrotubuli und verminderter Spannung zwischen Kinetochoren und Mikrotubuli führen. In 40% der Knockdownzellen wurden infolgedessen Segregationsdefekte beobachtet (Green et al. 2005; Asakawa et al., 2006 a; Asakawa et al., 2006 b). Bisher gibt es keine Veröffentlichungen, die die Auswirkungen erhöhter Level an EB1 beschreiben.

Ein weiteres Mikrotubuli-assoziiertes Protein, welches in MIN und CIN Zelllinien unterschiedlich exprimiert vorlag, ist MARK4. CIN Zelllinien wiesen eine deutlich erniedrigte Expression dieses Genes auf. Auch zum MARK4 Proteinprodukt gibt es derzeit erst wenige Studien. Interessant ist jedoch, dass die MARK4 Proteinkinase in kultivierten Zellen mit Centrosomen und Mikrotubuli kolokalisiert. Eine Überexpression dieses Genproduktes führt zu einer Schwächung des zellulären Mikrotubuli Netzwerkes (Trinczek et al., 2004; Ebner et al., 1999).

Auffallend war, dass sich unter den signifikant unterschiedlich exprimierten Genen, 3 Komponenten des Nukleären Transportsystems beziehungsweise des "Nuclear Pore Complex" (NPC) befanden (Abb. 4.3). Durch den NPC, welcher aus verschiedenen Nucleoporinen (Nups) aufgebaut ist, findet während der Interphase ein ständiger Im- und Export von Proteinen und Nucleinsäuren statt. Dieser Transport benötigt die GTPase Ran, welche die Interaktion zwischen den Transport-Karyopherinen mit den zu transportierenden Substanzen und den Nucleoporinen vermittelt. In den letzten Jahren wurde entdeckt, dass diese GTPase, neben ihrer Funktion im nukleozytoplasmatischen Transport, während der Mitose eine essentielle Rolle beim Spindelaufbau, der Chromatidensegregation und der Bildung einer neuen Kernhülle spielt (z.B. Quimby et al., 2003). Darüberhinaus wurden bereits einige Proteine, wie MAD2 identifiziert, die während der Interphase am NPC lokalisieren und nach dem Zusammenbruch der Kernhülle an die Kinetochoren wandern, wo sie für eine fehlerfreie Chromatidensegregation benötigt werden (Campbell et al, 2001; Louk et al., 2002). Die Genexpressionsanalysen von CIN und MIN Zellen zeigten, dass das

Gen für den "Nuclear transport factor 2" (NTF2) in CIN Zellen mit einem fold change von 2,3 vergleichsweise deutlich unterexprimiert vorlag. Dieses Protein ist dafür verantwortlich, Ran in GDP-gebundener Form in den Kern zu transportieren (Quimby et al., 2000). Die Menge an nukleärem Ran ist ein überaus kritischer Faktor für die Mitose. Erhöhte Level stören die Lokalisation von MAD2p und anderen Spindel Checkpointregulatoren in *Xenopus* Extrakten (Arnaoutov et al., 2003). Es wurde außerdem gezeigt, dass Hefezellen mit einer mutierten Form des NTF2, Ran nicht mehr effektiv in den Kern transportieren können und, infolgedessen, ihren Zellzyklus in G2 arretieren (Quimby et al., 2000). Interessanterweise ergab ein Datenvergleich der Expressionswerte von Fibroblasten und Lymphozyten alter und junger Spender, die während der Dissertation für eine gemeinsame Publikation erhoben wurden (Geigl et al., 2004) ebenfalls eine signifikante, vergleichsweise erniedrigte NTF2 Expression bei alten Spendern. Bei diesen Spendern wurden im Gegensatz zu jungen Vergleichspersonen auch vermehrt Aneuploidien beobachtet. Es wäre also durchaus denkbar, dass NTF2 eine Rolle bei der Entstehung von chromosomaler Instabilität im Alter und in Tumoren spielt.

Zwei weitere Genprodukte, die mit Ran interagieren und anhand der insgesamt allerdings sehr niedrigen Expressionswerte tendenziell unterschiedlich exprimiert vorlagen, sind Nup50 und das Ran-bindende Protein 6 (RanBP6). Nup50 ist ein mobiles Ran-bindendes Protein, welches als Co-Faktor des Impotin α/β -vermittelten Imports zwischen der zytoplasmatischen und der nukleären Seite der Kernmembran hin und her wandert (Lindsay et al., 2002). Auch dieses Protein liegt, den Expressionswerten zufolge, in CIN Zellen in niedrigeren Konzentrationen vor. Auch das Ran-bindende Protein 6 (RanBP6), wurde in CIN Zellen in vergleichsweise unterexprimierter Form vorgefunden. Nähere Funktionen dieses Proteins sind derzeit noch nicht bekannt.

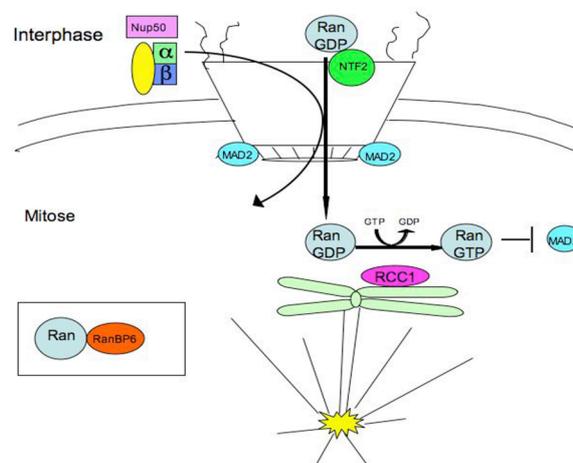


Abb. 4.3: Die Genprodukte des Nuclear Pore Complex NTF2, RanBP6 und Nup50, die im Vergleich zwischen MIN und CIN Zelllinien signifikant unterschiedlich exprimiert vorlagen.

4.2.3 Mögliche weiterführende Studien

Insgesamt lieferten die durchgeführten Genexpressionsanalysen mögliche Kandidatengene, deren veränderte Expression einen Einfluss auf die chromosomale Stabilität von kolorektalen Zelllinien haben könnte. Die Interaktion zwischen der GTPase Ran und Anaphase-regulatorischen Proteinen während der Schwesterchromatidentrennung, wurde in den letzten Jahren in verschiedenen Studien hervorgehoben. Über die Bedeutung der Proteinprodukte von EB1 und MARK4 für die chromosomale Stabilität gibt es derzeit erst wenige Veröffentlichungen. In weiterführenden Studien wäre es sinnvoll, zunächst zu testen, ob auch die Level der Proteinprodukte dieser Gene sich in CIN und MIN unterscheiden. Um herauszufinden, ob die Expressionslevel der hier diskutierten Gene eher einen destabilisierenden Einfluss auf CIN Zellen oder vielmehr einen stabilisierenden Einfluss auf MIN Zellen haben, wäre es notwendig, zusätzlich Expressionsanalysen von normalen kolorektalen Zelllinien durchzuführen. Diese Analysen könnten Hinweise darauf geben, ob es sogar möglicherweise Gene gibt, deren veränderte Expression MIN Zelllinien vor zusätzlicher chromosomaler Instabilität schützen. Wäre dies der Fall, sollte das MIN Zellsystem, für die Knockout-Analyse von "CIN-Genen" überdacht werden.

Weiterführende Analysen sollen die Bedeutung der Komponenten des Nuclear Pore Complex und, für die chromosomale Stabilität in kolorektalen Zelllinien näher untersuchen, konnten jedoch im Rahmen der Dissertation nicht mehr durchgeführt werden. Geplant sind hierbei zunächst Western Blot Analysen, die die Mengen an NTF2 Protein in CIN und MIN Zellen bestimmen sollen. Kombinatorische siRNA Experimente mit Oligos für das NTF2 Gen, oder vektorgestützte RNAi Experimente sollen anschließend Aufschluss darüber geben, welchen Einfluss verminderte NTF2 Level auf MIN Zelllinien wie HCT116 und DLD1, aber auch auf normale humane Zelllinien ausüben. Die Analysen der Knockoutzelllinien hCDC4^{-/-} und hSecurin^{-/-} haben gezeigt, dass es unterschiedlich sensitive Verfahren gibt, die chromosomale Stabilität von Zellen zu ermitteln und dass es, um funktionelle Rückschlüsse zu ziehen, stets notwendig ist, ein System über längere Zeit hinweg zu beobachten. Diese Erfahrungen sollten bei den Auswertungen der siRNA- oder RNAi-Versuche unbedingt berücksichtigt werden.

Eine wichtige Fragestellung, zu der es bisher kaum Studien gibt, ist, wie hoch die Aneuploidienrate von MIN Tumorzellen im Gewebeverband tatsächlich ist. Für das

Verständnis der frühen Tumorentstehung wäre es essentiell, herauszufinden, ob, beispielsweise mit Interphase-FISH, eine deutlich unterschiedliche Aneuploidienrate zwischen CIN und MIN Tumoren festgestellt werden kann. Auch das umliegende Normalgewebe sollte hierbei untersucht werden. Analysen an Zelllinien spiegeln nicht unbedingt die in vivo Situation wieder.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, erlauben sie jedoch wichtige funktionelle Aussagen über das Zusammenspiel von regulativen Proteinen, den zeitlichen Verlauf von Ereignissen wie der Entwicklung chromosomaler Instabilität und die Funktionsweise von redundanten Systemen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden in zwei Themenkomplexen unterschiedliche Aspekte der genetischen Instabilität und ihre Bedeutung für die frühe Tumorentstehung untersucht.

Die Basis für den ersten Themenkomplex bildeten Knockoutstudien, die gezeigt hatten, dass der Ausfall der regulativen Gene hSecurin und hCDC4 in diploiden kolorektalen MIN Zelllinien chromosomale Instabilität (CIN) auslösen kann. In der vorliegenden Arbeit konnte an Langzeitstudien dieser Knockoutzellen mit zytogenetischen und immunhistochemischen Methoden erstmalig nachgewiesen werden, dass der CIN-Phänotyp in beiden Zelllinien nur ein transienter Effekt ist. Mittels biochemischer und Genexpressionsanalysen wurden Hinweise auf Backup Mechanismen gewonnen, die die genomische Integrität beim Ausfall von Securin schützen könnten. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen die Bedeutung der "CIN-Gene" hCDC4 und hSecurin für die frühe Tumorentstehung in Frage und weisen auf bisher weitgehend unerforschte redundante Systeme hin. Diese Systeme sollten in weiterführenden funktionellen Studien näher untersucht werden, da sie Einblicke in das komplexe Zusammenspiel regulativer Gene während der Zellteilung geben und möglicherweise eine Bedeutung für therapeutische Ansätze haben.

In einem zweiten Themenkomplex der vorliegenden Dissertation wurden vergleichende Genexpressionsanalysen von kolorektalen Zelllinien mit Mikrosatelliteninstabilität (MIN) und kolorektalen Zelllinien mit chromosomaler Instabilität (CIN) durchgeführt. Hierbei wurden nicht nur Markergene identifiziert, die die beiden Klassen trennen, sondern auch Hinweise auf Kandidatengene gefunden, die eine Rolle bei der Erhaltung der chromosomalen Stabilität in kolorektalen Zellen spielen könnten. Diese Gene sollen in Zukunft mittels siRNA- und biochemischen Analysen näher untersucht werden. Darüberhinaus wären Expressionsvergleiche mit normalen kolorektalen Zelllinien interessant, um die Klassen CIN und MIN näher zu charakterisieren. Auch das Ausmaß der chromosomalen Instabilität von CIN- und MIN-Zellen im Gewebeverband ist ein weitgehend unerforschtes Gebiet. Weiterführende Analysen zu diesem Thema wären ein wichtiger Schritt für das Verständnis der frühen Tumorentwicklung.

6 Literaturverzeichnis

- Abrieu A, Kahana JA, Wood KW, Cleveland DW (2000). *CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint in vitro*. Cell 102: 817–826.
- Alexandru G, Uhlmann F, Mechtler K, Poupart MA, Nasmyth K (2001). *Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast*. Cell 105: 459-472.
- Ambroise C & McLachlan GJ (2002). *Selection bias in gene extraction on the basimicroarray gene-expression data*. Proc Natl Acad Sci USA 99: 6562-6566.
- Andrews CA, Diaz-Martinez LA, Gimenez-Abian JF, Guacci V, Vas AC, Clarke DJ (2005). *Evidence that the yeast spindle assembly checkpoint has a target other than the Anaphase Promoting Complex*. Cell Cycle 4: 1555-1557.
- Arnautov A, Dasso M (2003). *Ran GTPase regulates kinetochore function*. Dev Cell: 99-111.
- Arnautov A, Dasso M (2005). *Ran-GTP regulates kinetochore attachment in somatic cells*. Cell Cycle: 1161-1165.
- Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, DePinho RA (2000). *Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice*. Nature 406: 641-645.
- Asakawa K, Kume K, Kanai M, Goshima T, Miyahara K, Dhut S, Tee WW, Hirata D, Toda T (2006). *The V260I mutation in fission yeast alpha-tubulin Atb2 affects microtubule dynamics and EB1-Mal3 localization and activates the Bub1 branch of the spindle checkpoint*. Mol Biol Cell 17: 1421-1435.
- Asakawa K, Toda T (2006). *Cooperation of EB1-Mal3 and the Bub1 spindle checkpoint*. Cell Cycle 5: 27-30.
- Azofeifa J, Fauth C, Kraus J, Maierhofer C, Langer S, Bolzer A., Reichman J., Schuffenhauer S., Speicher MR (2000). *An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH*. Am J Hum Genet 66: 1684–1688.
- Babu JR, Jeganathan KB, Baker DJ, Wu X, Kang-Decker N, van Deursen JM (2003). *Rae1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation*. J Cell Biol 160: 341-353.
- Baker DJ, Jeganathan KB, Cameron JD, Thompson M, Juneja S, Kopecka A, Kumar R, Jenkins RB, de Groen PC, Roche P, van Deursen JM (2004). *BubR1 insufficiency causes early onset of aging associated phenotypes and infertility in mice*. Nat Genet 36: 744-749.
- Barr FA, Sillje HH, Nigg EA (2004). *Polo-like kinases and the orchestration of cell division*. Nat Rev Mol Cell Biol 5: 429-440.

- Bernal JA, Luna R, Espina A, Lazaro I, Ramos-Morales F, Romero F, Arias C, Silva A, Tortolero M, Pintor-Toro JA (2002). *Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis*. Nat Genet 32: 306-311.
- Bischoff FR, Ponstingl H (1991). *Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1*. Nature 354: 80-82.
- Boelaert K, McCabe CJ, Tannahill LA, Gittoes NJ, Holder RL, Watkinson JC, Bradwell AR, Sheppard MC, Franklyn JA (2003). *Pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor-2 expression: potential prognostic indicators in differentiated thyroid cancer*. J Clin Endocrinol Metab 88: 2341-2347.
- Borel F, Lohez OD, Lacroix FB, Margolis, RL (2002). *Multiple centrosomes arise from tetraploidy checkpoint failure and mitotic centrosome clusters in p53 and RB pocket protein-compromised cells* Proc Natl Acad Sci USA 99: 9819–9824.
- Boveri T (1914). *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*. Gustav Fischer Verlag
- Bronner, C.E., Baker, S.M., Morrison, PT (1994). *Mutations in the DNA mismatch repair homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer*. Nature 368: 258-261.
- Bunz F, Fauth C, Speicher MR, Dutriaux A, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C (2002) *Targeted inactivation of p53 in human cells does not result in aneuploidy*. Cancer Res 62: 1129–1133.
- Burns TF, Fei P, Scata KA, Dicker DT, El-Deiry WS (2003) *Silencing of the novel p53 target gene Snk/Plk2 leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells*. Mol Cell Biol 23: 5556-5571.
- Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C (1999). *Genetic instability and Darwinian selection in tumours*. Trends Cell Biol 9: M57–M60.
- Cahill, DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein (1998). *Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers*. Nature 392: 300–303.
- Campbell MS, Chan GK, Yen TJ (2001). *Mitotic checkpoint proteins HsMAD1 and HsMAD2 are associated with nuclear pore complexes in interphase*. J Cell Sci 114: 953-963.
- Chan GK, Jablonski SA, Starr DA, Goldberg ML & Yen TJ (2000). *Human Zw10 and ROD are mitotic checkpoint proteins that bind to kinetochores*. Nature Cell Biol 2: 944–947.
- Chan GK, Jablonski SA, Sudakin V, Hittle JC, Yen, TJ (1999). *Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC*. J Cell Biol 146: 941–954.
- Cimini D, Howell B, Maddox P, Khodjakov A, Degrossi F, Salmon ED (2001). *Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells*. J Cell Biol 153: 517-527.

Ciosk R, Zachariae W, Michaelis C, Shevchenko A, Mann M, Nasmyth K (1998). *An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast*. Cell 93: 1067–1076.

Cohen-Fix O, Peters JM, Kirschner MW, Koshland D (1996). *Anaphase initiation in Saccharomyces cerevisiae is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p*. Genes Dev 10: 3081–3093.

Courjal F, Louason G, Speiser P, Katsaros D, Zeillinger R, Theillet C (1996). *Cyclin gene amplification and overexpression in breast and ovarian cancers: evidence for the selection of cyclin D1 in breast and cyclin E in ovarian tumors*. Int J Cancer 69: 247-253.

Cristianini N, Shawe-Taylor J (2000). *Support vector machines and other kernel-based learning methods*. Cambridge University Press.

Dai W, Wang Q, Liu T, Swamy M, Fang Y, Xie S, Mahmood R, Yang YM, Xu M, Rao CV (2004). *Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency*. Cancer Res 64: 440–445.

Deng C X (2002). *Roles of BRCA1 in centrosome duplication*. Oncogene 21: 6222–6227.

Draviam VM, Xie S, Sorger PK (2004). *Chromosome segregation and genomic stability*. Curr Opin Genet Dev 14: 120-125.

Duesberg P, Rasnick D., Li R, Winters L, Rausch C, Hehlmann R (1999). *How aneuploidy may cause cancer and genetic instability*. Anticancer Res 19: 4887–4906.

Dunican DS, McWilliam P, Tighe O, Parle-McDermott A, Croke DT (2002). *Gene expression differences between the microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN) phenotypes in colorectal cancer revealed by high-density cDNA array hybridization*. Oncogene 21: 3253-3257.

Ebneth A, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E (1999). *Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells*. Cell Motil Cytoskeleton 44: 209-224.

Eils R, Uhrig S, Saracoglu K, Satzler K, Bolzer A, Petersen I, Chassery J, Ganser M, Speicher MR (1998). *An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH)*. Cytogenet Cell Genet 82: 160-171.

Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S (2006). *The epigenetic progenitor origin of human cancer*. Nat Rev Genet 7: 21-33.

Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS (1997). *The human mutator gene homologue MSH2 and its association with hereditary non-polyposis colon cancer*. Cell 75: 1027-1038.

Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, van Es JH, Breukel C, Wiegant J, Giles RH, Clevers H (2001). *Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability*. Nature Cell Biology 3: 433-438.

Fodde R & Smits R (2002). *Cancer biology. A matter of dosage*. Science 298: 761–763.

- Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova EV, Bronson RT, Pellman D (2005). *Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells* Nature 437: 1043–1047.
- Fukasawa K, Choi T, Kuriyama R, Rulong S, Vande Woude GF (1996). *Abnormal centrosome amplification in the absence of p53*. Science 271: 1744–1747.
- Fukushima H, Yamamoto H, Itoh F, Horiuchi S, Min Y, Iku S, Imai K (2001). *Frequent alterations of the beta-catenin and TCF-4 genes, but not of the APC gene, in colon cancers with high-frequency microsatellite instability*. J Exp Clin Cancer Res 20: 553-559.
- Funabiki H, Yamano H, Kumada K, Nagao K, Hunt T, Yanagida M (1996). *Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast*. Nature 381: 438–441
- Geigl JB, Langer S, Barwisch S, Pfliegerhaer K, Lederer G, Speicher MR (2004). *Analysis of gene expression patterns and chromosomal changes associated with aging*. Cancer Res 64: 8550-8557.
- Giacomini CP, Leung SY, Chen X, Yuen ST, Kim YH, Bair E, Pollack JR (2005). *A gene expression signature of genetic instability in colon cancer*. Cancer Res 65: 9200-9205.
- Gimenez-Abian JF, Sumara I, Hirota T, Hauf S, Gerlich D, de la Torre C, Ellenberg J, Peters JM (2004) *Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms*. Current Biology 14: 1187-1193.
- Gimenez-Abian JF, Diaz-Martinez LA, Waizenegger IC, Gimenez-Martin G, Clarke DJ (2005). *Separase is required at multiple pre-anaphase cell cycle stages in human cells*. Cell Cycle 4: 1576-1584.
- Gorr IH, Boos D, Stemmann O (2005). *Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation*. Mol Cell 19: 135–141.
- Green RA, Wollman R, Kaplan KB (2005). *APC and EB1 function together in mitosis to regulate spindle dynamics and chromosome alignment*. Mol Biol Cell 16: 4609-22.
- Grigorova M, Staines JM, Ozdag H, Caldas C, Edwards PA (2004). *Possible causes of chromosome instability: comparison of chromosomal abnormalities in cancer cell lines with mutations in BRCA1, BRCA2, CHK2 and BUB1*. Cytogenet Genome Res 104: 333-340.
- Gruber S, Haering CH, Nasmyth K (2003) *Chromosomal cohesin forms a ring*. Cell 112: 765–777.
- Guacci V, Koshland D, Strunnikov A (1997). *A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in S. cerevisiae*. Cell 91: 47-57.
- Guyon I, Weston J, Barnhill S, Vapnik V (2002.) *Gene selection for cancer classification using support vector machines*. Machine Learning 46: 389

- Haering CH, Nasmyth K (2003). *Building and breaking bridges between sister chromatids*. *Bioessays* 25: 1178–1191.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). *The hallmarks of cancer*. *Cell* 100: 57-70.
- Hauf S, Roitinger E, Koch B, Dittrich CM, Mechtler K, Peters JM (2005) *Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2*. *PLoS Biol* 3: e69.
- Hauf S, Waizenegger IC, Peters JM (2001). *Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells*. *Science* 293: 1320–1323.
- Heim S & Mitelman F (1995). *Cancer Cytogenetics* (Wiley Liss Inc., New York)
- Hornig NC, Knowles PP, McDonald NQ, Uhlmann F (2002). *The dual mechanism of separase regulation by securin*. *Curr Biol* 12: 973-82.
- Huang X, Hatcher R, York JP, Zhang P (2005). *Securin and separase phosphorylation act redundantly to maintain sister chromatid cohesion in mammalian cells*. *Mol Biol Cell* 16: 4725–4732.
- Iouk T, Kerscher O, Scott RJ, Basrai MA, Wozniak RW (2002). *The yeast nuclear pore complex functionally interacts with components of the spindle assembly checkpoint*. *J Cell Biol* 159: 807-819
- Jager H, Herzig A, Lehner CF, Heidmann S (2001). *Drosophila separase is required for sister chromatid separation and binds to PIM and THR*. *Genes Dev* 15: 2572-2584
- Jallepalli PV, Waizenegger IC, Bunz F, Langer S, Speicher MR, Peters JM, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C (2001). *Securin is required for chromosomal stability in human cells*. *Cell* 105: 445–457.
- Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R (1997). *Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines*. *Cancer Res* 57: 808-811.
- Kaplan KB, Burds AA, Swedlow JR, Bekir SS, Sorger PK, Nathke IS (2001). *A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation*. *Nature Cell Biology* 3: 429-432.
- Kemp Z, Rowan A, Chambers W, Wortham N, Halford S, Sieber O, Mortensen N, von Herbay A, Gunther T, Ilyas M, Tomlinson I (2005). *CDC4 mutations occur in a subset of colorectal cancers but are not predicted to cause loss of function and are not associated with chromosomal instability*. *Cancer Res* 65: 11361-11366.
- Kinzler KW, Vogelstein B (1997). *Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers*. *Nature* 386: 761-763.
- Kireeva N, Lakonishok M, Kireev I, Hirano T, Belmont AS (2004). *Visualization of early chromosome condensation: a hierarchical folding, axial glue model of chromosome structure*. *J Cell Biol* 166: 775-785.

- Koepp DM, Schaefer LK, Ye X, Keyomarsi K, Chu C, Harper JW, Elledge SJ (2001). *Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase*. Science 294: 173-177.
- Kops GJ, Foltz DR, Cleveland DW (2004). *Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint*. Proc Natl Acad Sci USA 101: 8699-8704.
- Leismann O, Herzig A, Heidmann S, Lehner CF (2000). *Degradation of Drosophila PIM regulates sister chromatid separation during mitosis*. Genes Dev. 14: 2192-2205.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997). *Genetic instability in colorectal cancers*. Nature 386: 623-627.
- Li HY, Zheng Y (2004). *The production and localization of GTP-bound ran in mitotic mammalian tissue culture cells*. Cell Cycle 3: 993-5.
- Li Y, Benezra R (1996). *Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2*. Science 274: 246-248.
- Lindblom A (2001). *Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers*. Curr Opin Oncol 13: 63-69.
- Lindsay ME, Plafker K, Smith AE, Clurman BE, Macara IG (2002). *Npap60/Nup50 is a tri-stable switch that stimulates importin alpha:beta-mediated nuclear protein import*. Cell 110: 349-360.
- Loeb LA (1991). *Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis*. Cancer Res 51: 3075-3079.
- Loeb LA (1994). *Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer*. Cancer Res 54: 5059-5063.
- Loeb LA (2001). *A mutator phenotype in cancer*. Cancer Res 61: 3230-3239.
- Losada A, Hirano M, Hirano T (1998). *Identification of Xenopus SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion*. Genes Dev 12: 1986-1997.
- Maciaszczyk E, Ulaszewski S, Lazowska J (2004). *Intragenic suppressors that restore the activity of the maturase encoded by the second intron of the Saccharomyces cerevisiae cyt b gene*. Curr Genet 46: 67-71.
- Mao, Y, Abrieu, A & Cleveland, DW (2003). *Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-Edependent activation/inactivation of BubR1*. Cell 114: 87-98.
- Margolis, RL, Lohez, OD, Andreassen, PR (2003). *G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis*. J Cell Biochem 88: 673-683.
- McGuinness BE, Hirota T, Kudo NR, Peters JM, Nasmyth K (2005). *Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells*. PLoS Biol 3: e86.

- Mei J, Huang X, Zhang P (2001). *Securin is not required for cellular viability, but is required for normal growth of mouse embryonic fibroblasts*. *Current Biology* 11: 1197–1201.
- Michaelis C, Ciosk R, Nasmyth K (1997). *Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids*. *Cell* 91: 35-45.
- Michel ML, Diaz-Rodriguez E, Narayan G, Hernando E, Murty VV, Benezra R. (2004). *Complete loss of the tumor suppressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 4459–4464.
- Michel ML, Diaz-Rodriguez E, Narayan G, Hernando E, Murty VV, Benezra R. (2001). *MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells*. *Nature* 409: 355–359.
- Michor F, Iwasa Y, Lengauer C, Nowak MA (2005). *Dynamics of colorectal cancer*. *Semin Cancer Biol* 15: 484–493.
- Musio A, Montagna C, Zambroni D, Indino E, Barbieri O, Citti L, Villa A, Ried T, Vezzi P (2003). *Inhibition of BUB1 results in genomic instability and anchorage independent growth of normal human fibroblasts*. *Cancer Res* 63: 2855-63.
- Nasmyth K, Peters JM, Uhlmann F (2000). *Splitting the chromosome: Cutting the ties that bind sister chromatids*. *Science* 288: 1379–1385.
- Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu, B (1994). *Mutations of two PMS homologues in hereditary non-polyposis colon cancer*. *Nature* 371: 75-80
- Nigg EA (2002). *Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression?* *Nat Rev Cancer* 2: 815–825.
- Nowell, PC (1976). *The clonal evolution of tumor cell populations*. *Science* 194: 23-28.
- Ohtsubo M, Okazaki H, Nishimoto T (1989). *The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA*. *J Cell Biol* 109: 1389-1397.
- Papi M, Berdugo E, Randall C, Ganguly S, Jallepalli P. (2005) *Multiple roles for separase auto-cleavage during the G2/M transition*. *Nat Cell Biol* 7: 1029-1035.
- Pei L & Melmed S (1997). *Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG)*. *Mol Endocrinol* 11: 433–441.
- Quimby BB, Arnaoutov A, Dasso M (2005). *Ran GTPase regulates Mad2 localization to the nuclear pore complex*. *Eukaryot Cell* 4: 274-280.
- Quimby BB, Dasso M (2003). *The small GTPase Ran: interpreting the signs*. *Curr Opin Cell Biol* 15: 338-344
- Quimby BB, Wilson CA, Corbett AH (2000). *The interaction between Ran and NTF2 is required for cell cycle progression*. *Mol Biol Cell* 11: 2617-2629.

Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C (2004). *Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability*. Nature 428: 77-81.

Ramos-Morales F, Dominguez A, Romero F, Luna R, Multon MC, Pintor-Toro JA, Tortolero M (2000). *Cell cycle regulated expression and phosphorylation of hpttg protooncogene product*. Oncogene 19: 403–409.

Rhee I, Jair KW, Yen RW, Lengauer C, Herman JG, Kinzler KW, Vogelstein B, Baylin SB, Schuebel KE (2000). *CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1*. Nature 404: 1003-1007.

Rieder CL, Maiato H (2004). *Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint*. Dev Cell 7: 637-651.

Rieder CL, Schultz A, Cole R, Sluder G (1994). *Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle*. J Cell Biol 127: 1301-1310.

Risques RA, Moreno V, Marcuello E, Petriz J, Cancelas JA, Sancho FJ, Torregrosa A, Capella G, Peinado MA (2001). *Redefining the significance of aneuploidy in the prognostic assessment of colorectal cancer*. Lab Invest 81: 307-315.

Saez C, Japon MA, Ramos-Morales F, Romero F, Segura DI, Tortolero M, Pintor-Toro JA (1999). *Hpttg is over-expressed in pituitary adenomas and other primary epithelial neoplasias*. Oncogene 18: 5473–5476.

Salic A, Waters JC, Mitchison TJ (2004). *Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis*. Cell 118: 567-578.

Sharpless NE, DePinho RA (2004). *Telomeres, stem cells, senescence, and cancer*. J Clin Invest 113: 160-168.

Shi Q & King RW (2005). *Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines*. Nature 437: 1038–1042.

Skoufias DA, Lacroix FB, Andreassen PR, Wilson L, Margolis RL (2004). *Inhibition of DNA decatenation, but not DNA damage, arrests cells at metaphase*. Mol Cell 16: 977–990.

Solbach C, Roller M, Fellbaum C, Nicoletti M, Kaufmann M (2004). *PTTG mRNA expression in primary breast cancer: a prognostic marker for lymph node invasion and tumor recurrence*. Breast 13: 80-81.

Speicher MR, Ballard SG, Ward DC (1996). *Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH*. Nature Genetics 12: 368–375.

Spruck CH, Won KA, Reed SI (1999). *Deregulated cyclin E induces chromosome instability*. Nature 401: 297-300.

Stemmann O, Boos D, Gorr IH (2005). *Rephrasing Anaphase: Separase FEARs shugoshin*. Chromosoma 113: 409–417.

- Stemmann O, Zou H, Gerber SA, Gygi SP, Kirschner MW (2001). *Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase*. Cell 107: 715–726.
- Storchova Z & Pellman D (2004). *From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol 5: 45–54.
- Strachan T & Read AP (2003), *Human Molecular Genetics*, Garland Science Verlag, New York, USA.
- Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Peters, TD (1993). *Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair*. Nature 365: 274-276.
- Tang Z, Sun Y, Harley SE, Zou H, Yu H (2004). *Human Bub1 protects centromeric sister-chromatid cohesion through Shugoshin during mitosis*. Proc Natl Acad Sci USA 101: 18012-18017.
- Taylor SS & McKeon F (1997). *Kinetochore localization of murine BUB1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage*. Cell 89: 727-735.
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A (1992). *Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer*. Genomics 13: 718-725.
- Tighe A, Johnson VL, Albertella M, Taylor SS (2001). *Aneuploid colon cancer cells have a robust spindle checkpoint*. EMBO Rep 2: 609-614.
- Tomlinson IP, Novelli MR, Bodmer WF (1996). *The mutation rate and cancer*. Proc Natl Acad Sci USA 93: 14800-14803.
- Torres-Rosell J, Machin F, Farmer S, Jarmuz A, Eydmann T, Dalgaard JZ, Aragon L (2005). *SMC5 and SMC6 genes are required for the segregation of repetitive chromosome regions*. Nat Cell Biol 7: 412-419.
- Trinczek B, Brajenovic M, Ebnet A, Drewes G (2004). *MARK4 is a novel microtubule-associated proteins/microtubule affinity-regulating kinase that binds to the cellular microtubule network and to centrosomes*. J Biol Chem 279: 5915-5923.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001). *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response*. Proc Natl Acad Sci USA 98: 5116-5121.
- Uetake Y, & Sluder G (2004). *Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a "tetraploidy checkpoint"*. J Cell Biol 165: 609–615.
- Uhlmann F, Lottspeich F, Nasmyth K (1999). *Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1*. Nature 400: 37-42.
- Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD (1998). *Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers*. Proc Natl Acad Sci USA 95: 8698-8702

- Viadiu H, Stemmann O, Kirschner MW, Walz T (2005). *Domain structure of separase and its binding to securin as determined by EM*. Nat Struct Mol Biol 12: 552-553.
- Waizenegger IC, Hauf S, Meinke A, Peters JM (2000). *Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase*. Cell 103: 399-410.
- Wang SI, Puc J, Li J, Bruce JN, Cairns P, Sidransky D, Parsons R (1997). *Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme*. Cancer Res 57: 4183-4186.
- Wang Z, Cummins JM, Shen D, Cahill DP, Jallepalli PV, Wang TL, Parsons DW, Traverso G, Awad M, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Willson JK, Markowitz SD, Goldberg ML, Karess R, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE, Lengauer C (2004). *Three classes of genes mutated in colorectal cancers with chromosomal instability*. Cancer Res 64: 2998-3001.
- Wang RH, Yu H, Deng CX (2004). *A requirement for breast-cancer-associated gene 1 (BRCA1) in the spindle checkpoint*. Proc Natl Acad Sci USA 101: 17108-17113
- Wapner RJ, Lewis D (2002). *Genetics and metabolic causes of stillbirth*. Semin Perinatol 26: 70-74
- Watanabe Y (2004). *Modifying sister chromatid cohesion for meiosis*. J Cell Sci. 117: 4017-4023.
- Wong C & Stearns T (2005). *Mammalian cells lack checkpoints for tetraploidy, aberrant centrosome number, and cytokinesis failure*. BMC Cell Biol 6: 6.
- Yamamoto A, Guacci V, Koshland D (1996). *Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol 133: 85-97.
- Yanagida M. *Cell cycle mechanisms of sister chromatid separation; roles of Cut1/separin and Cut2/securin*. Genes Cells 5: 1-8.
- Yu H, Tang Z (2005). *Bub1 multitasking in mitosis*. Cell Cycle 4: 262-265.
- Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, Sen ST (1998). *Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation*. Nat Genet 20: 189-193.
- Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW (1999). *Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis*. Science 285: 418-422.

7 Publikationen

Pfleghaar K, Heubes S, Cox J, Stemmann O, Speicher MR (2005). *Securin is not required for chromosomal stability in human cells*. PLoS Biol.3(12) :e416

Geigl JB, Langer S, Barwisch S, Pfleghaar K, Lederer G, Speicher MR (2004). *Analysis of gene expression patterns and chromosomal changes associated with aging*. Cancer Res 64(23): 8550-8557.

8 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Thomas Cremer für die Übernahme des Erstgutachtens und für die Möglichkeit, an seinem Institut arbeiten zu dürfen.

In den folgenden Zeilen danke ich allen Kollegen im Labor der Trogerstraße dafür, dass wir in den letzten Jahren so eine schöne Zeit zusammen hatten und dass sich aus dieser Arbeit so gute Freundschaften entwickelt haben.

Hier bedanke ich mich an erster Stelle bei meinem Betreuer Herrn Professor Michael Speicher für seine beständige Unterstützung, seine gelassene und lustige Art und dafür, dass er mir manchmal mehr vertraut hat als ich mir selbst .

Sabine Langer danke ich für ihre Freundschaft und Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit.

Corinna Keri für die Einführung in die Zellkultur und Metaphasenpräparation und dafür, dass man sich mit ihr immer über alles unterhalten konnte.

Simone Brero danke ich für unsere jahrelange Freundschaft, die gute Zusammenarbeit und mein Patenkind Lucia.

Auch bei Marion Fürst, Cora Beier, Gisela von Hoven, Christine von Törne, Melanie Odenigbo, Jürgen Kraus und Christine Mayr bedanke ich mich dafür, dass wir uns sowohl in der Arbeit als auch privat so gut verstanden haben. Christine Mayr danke ich ganz besonders für ihre Freundschaft, die vielen lustigen Telefonate und die Tipps für USA, Cora Beier für das geduldige Beantworten vieler Fragen und Marion Fürst dafür, dass es mir so viel Spaß gemacht hat, sie zu betreuen.

Carmen Meier danke ich dafür, dass sie es bisher noch nicht aufgegeben hat, mich zum Sport zu überreden.

Auch Dr. Babett Heye, Doris Sollacher, Gaby Lederer und Jochen Geigl danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ich möchte mich bei Dr Bert Vogelstein für die Bereitstellung der Knockoutzelllinien bedanken.

Ich bedanke mich weiterhin bei Jörg Mages, Roland Lang, Renate Siegelmann und Angela Servatius für die Hilfe bei den Array-Experimenten und bei Jürgen Cox für die statistischen Auswertungen der Expressionsdaten.

Simone Heubes und Olaf Stemmann möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung der Separase Experimente danken. Vielen Dank an Simone Heubes für die netten Kaffeepausen zwischen den Versuchen.

Für die Kultivierung der hCDC4 Wildtyp- und Knockoutzellen bedanke ich mich bei Dr.Heiko Hermeking, Alex Epanchintsev und Nils Hoffmann.

Marion Cremer danke ich dafür, dass sie mich so herzlich im Biozentrum aufgenommen hat und für das unermüdliche Auszählen von ca 8000 Mikronuklei.

Ich bedanke mich ganz besonders bei Sascha Bercht, obwohl (oder gerade weil) er das überhaupt nicht möchte.

Bei meinen Eltern Marianne und Wolfgang Pfleghaar möchte ich mich für ihre Liebe und Freundschaft bedanken und dafür, dass sie mich immer unterstützt und mir so viele Freiheiten gegeben haben.

9 Lebenslauf

Name: Katrin Susanne Pflöghaar
Geburtsdatum: 25.03.1977
Geburtsort: München
Adresse: Häberlstraße 19; 80337 München
Telefon: 089.97347511
Email: pflöghaar@humangenetik.med.tu-muenchen.de

Schulbildung:

1983 - 1987 Grundschule Bayernschule, München
1987 - 1996 Willi Graf Gymnasium, München

Hochschulbildung:

1996 - 2002 Diplomstudium Biologie an der Ludwig Maximilians Universität, München
Seit 2003 Doktorarbeit am Institut für Humangenetik der Technischen Universität München

Teilnahme an Meetings und Konferenzen

2004 First Marie Curie Conferences and Training Courses on arrayCGH and Molecular Cytogenetics, Hinxton, UK
2006 Deutscher Kongress der Gesellschaft für Humangenetik (GfH), Heidelberg, Deutschland

Methoden

Zytogenetik: 7-Fluorochrom Multiplex-FISH, Interphase-FISH, 3D FISH, Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH), Epifluoreszenz Mikroskopie

Array-Techniken	Affymetrix-basierte Genexpressionsarrays
Einzelzelltechniken	Isolierung von Einzelzellen mit Laser Dissection (LMPC), Amplifikation, single cell CGH
Weitere:	siRNA Anwendungen, PCR, Immunfluoreszenz, Zellkultur

Publikationen

- **Pfleghaar K**, Heubes S, Cox J, Stemmann O, Speicher MR (2005). Securin Is Not Required for Chromosomal Stability in Human Cells. PLoS Biol. 3(12):e416
- Geigl JB, Langer S, Barwisch S, **Pfleghaar K**, Lederer G, Speicher MR (2004). Analysis of gene expression patterns and chromosomal changes associated with aging. Cancer Res. 64(23):8550-7.

Sonstige berufliche Erfahrungen

1997 - 2002	Mitarbeit in der Patentanwaltskanzlei "Kador und Partner", München
--------------------	---