

Untersuchungen zum Spleißvorgang von MDMX nach DNA-Schäden in der Ovarialkarzinomzelllinie OAW-42

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)



vorgelegt der

Naturwissenschaftliche Fakultät I

– Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

von

Frau Diplom-Biochemikerin

Anja Wolf

geb. am 21.02.1983 in Halle

Gutachter: 1. Prof. Dr. E. Wahle
2. PD Dr. F. Bartel
3. Prof. Dr. H. Taubert

Halle/Saale, den 31.7.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Spleißen humaner Gene	1
1.1.1	Konstitutiver Spleißmechanismus	1
1.1.2	Alternatives Spleißen	2
1.1.3	Zusammenhang zwischen alternativem Spleißen und Krankheitsentstehung	4
1.1.4	<i>Nonsense-mediated mRNA-decay</i> (NMD)	4
1.2	p53	6
1.2.1	Struktur und Funktion	6
1.2.2	Regulation von p53 durch die onkogenen Proteine MDMX und MDM2	8
1.3	MDMX	9
1.3.1	Struktur und Funktion	9
1.3.2	Spleißvarianten von MDMX	11
1.3.3	Bedeutung von MDMX in der Krebsentstehung und -therapie	12
1.4	Wirkungsweise von Zytostatika	14
1.4.1	Cisplatin	14
1.4.2	Camptothecin	15
1.5	Zelluläre Reaktion auf einen DNA-Schaden	15
1.5.1	Der DNA-Damage-Pathway	15
1.5.2	Einfluss von DNA-Schäden auf das Spleißen	17
1.6	Zielsetzung	19

2. Material

2.1	Zelllinien	20
2.2	Chemikalien und Reagenzien	20
2.3	Kits	22
2.4	Enzyme	23
2.5	Oligonukleotide	23
2.6	Antikörper	25
2.7	Verbrauchsmittel und Geräte	25

3. Methoden

3.1	Zellkulturen	27
-----	--------------	----

3.1.1	Zytotoxizitätsassay	27
3.1.2	Behandlung von Zellen mit Zytostatika	28
3.2	Präparation von Nukleinsäuren	28
3.2.1	Isolation von DNA aus Zellkulturen	28
3.2.2	Isolation von Plasmid-DNA	28
3.2.3	DNA-Konzentrationsbestimmung	29
3.2.4	Isolation von RNA aus Zellkulturen	29
3.2.5	RNA-Konzentrationsbestimmung	29
3.3	Reverse Transkriptions-Reaktion	29
3.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	30
3.4.1	Nachweis der MDMX Transkripte	30
3.4.2	Nachweis der Deletion von Exon 4 und Exon 6	31
3.4.3	Nachweis des housekeepinggens GAPDH	31
3.5	Quantitative Real-Time-PCR	32
3.6	Sequenzierreaktion	33
3.7	DNA-Untersuchungen	34
3.7.1	Agarosegelelektrophorese	34
3.7.2	DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen	34
3.8	Klonierung von DNA-Fragmenten	35
3.8.1	Ligation	35
3.8.2	Transformation	35
3.9	Western-Blot	35
3.9.1	Isolation von Gesamtproteinlysat	35
3.9.2	Protein-Konzentrationsbestimmung	36
3.9.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	36
3.9.4	Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran	36
3.9.5	Immundetektion	37
3.10	RNA-Pull-Down	37
3.10.1	Amplifikation des RNA-Fragments	37
3.10.2	In vitro Transkription	38
3.10.3	Blockierung beads und RNA-Bindung	39
3.10.4	Präzipitation der RNA-Bindeproteine	40
3.10.5	Silberfärbung	41

3.11	Transfektionsversuche	42
3.11.1	Transfektion von siRNA	42
3.11.2	Transfektion des pC3.1-p53 Expressionsvektor	43
3.12	Nutzung von Internet Webseiten	43
4.	Ergebnisse	
4.1	Untersuchungen zur MDMX-Expression nach DNA-Schäden	44
4.1.1	Expression von MDMX nach Behandlung mit Cisplatin	45
4.1.2	Einfluss von Cisplatin auf das Spleißen der MDMX-mRNA	48
4.1.3	Expression von MDMX nach Behandlung mit Camptothecin	54
4.1.4	Einfluss von Camptothecin auf das Spleißen der MDMX-mRNA	57
4.1.5	Überprüfung der Transkriptvariante MDMX-S auf möglichen Abbau durch den <i>nonsense-mediated mRNA-decay</i> (NMD)	61
4.2	Untersuchungen zum alternativen Spleißvorgang des Exon 6 von MDMX	63
4.2.1	Identifizierung von Proteinen des alternativen Spleißprozesses von Exon 6 der MDMX-mRNA mittels RNA-Pull-Down	63
4.2.2	Einfluss der Spleißfaktoren PUF60 und hnRNP-C beim Spleißen der MDMX-mRNA	67
4.2.3	Expression von PUF60 und hnRNP-C nach Stressinduktion	71
4.3	Bedeutung von Proteinen des DNA-Damage-Pathways beim Spleißen der MDMX-mRNA	73
4.3.1	Einfluss der Kinasen ATM und ATR im alternativen Spleißprozess der MDMX-mRNA	73
4.3.2	Einfluss des Tumorsuppressors p53 im alternativen Spleißprozess der MDMX-mRNA	79
5.	Diskussion	
5.1	MDMX-Expression nach DNA-Schäden	87
5.2	MDMX-S ist ein Substrat des NMD	91
5.3	Regulation des Spleißens von Exon 6 durch die Spleißfaktoren PUF60 und hnRNP-C	94
5.4	Einfluss der Kinasen ATM und ATR beim Spleißen der MDMX-mRNA	97
5.5	Einfluss von p53 beim Spleißen der MDMX-mRNA	99

6.	Zusammenfassung und Ausblick	101
7.	Literaturverzeichnis	103
8.	Anhang	
8.1	Abkürzungsverzeichnis	113
8.2	MDMX-mRNA Sequenz (2554 bp)	115
8.3	Gensequenzen von MDMX	116
8.4	WST-Test von Cisplatin und Camptothecin	117
8.5	Silbergefärbtes Gel nach RNA-Pull-Down	118
8.6	Proteinlisten der massenspektrometrischen Analyse	119
	Curriculum Vitae	
	Publikationsliste	
	Danksagung	
	Erklärung	

1. Einleitung

1.1 Spleißen humaner Gene

1.1.1 Konstitutiver Spleißmechanismus

Das Genom von Eukaryoten liegt als Exon- und Intronstruktur vor. Dabei bilden Introns mit ca. 95 % der chromosomalen DNA den Hauptanteil und nur 5 % enthalten in Protein kodierende Information. Die kodierenden Bereiche werden durch die intronischen Sequenzen unterbrochen. Durch den konstitutiven Spleißmechanismus werden die intronischen Sequenzen entfernt. Diese Reaktion findet im Zellkern ko- bzw. posttranskriptionell statt. Nur 2-3 % der transkribierten mRNAs kodieren für ein Protein [Mattick et al. 2003].

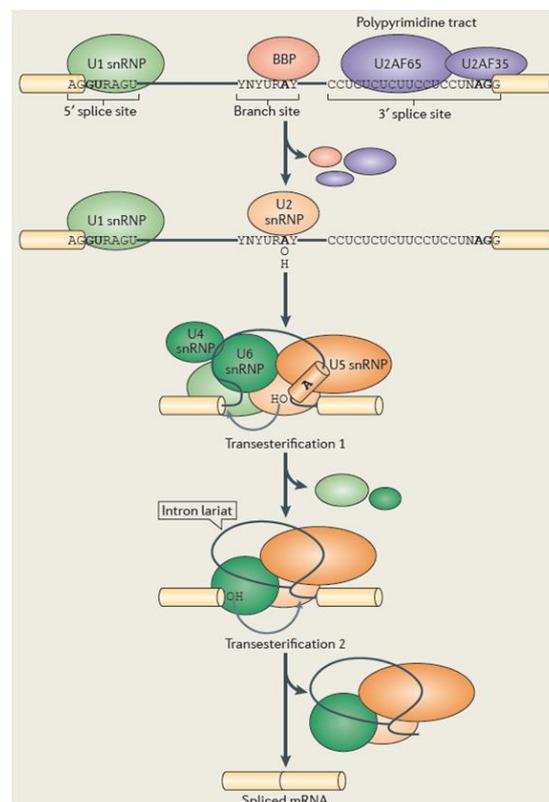


Abb. 1-1: Zweistufiger Spleißprozess

Die Spleißreaktion wird über das Spleißosom vermittelt. Die erste Umesterung entsteht durch den Angriff einer 2'-OH Gruppe auf ein Adenosin in der Branch-Point-Sequenz. Es entsteht eine Intron-Lariat-Struktur. Bei der zweiten Umesterung greift das freie 3'-OH des *upstream* Exons die 3'-Spleißstelle an. Daraus entstehen die Fusion der Exone und die Deletion des Introns. (BBP = Branch-Point-Bindeprotein, snRNP = small nuclear Ribonukleoproteine) [Kornblihtt et al. 2013]

Das Spleißen erfolgt durch das Spleißosom. Jurica und Moore (2003) identifizierten rund 200 Proteine, die das Spleißosom bilden. Das Spleißosom beinhaltet die 5`- und 3`-Spleißstellen, den Branch-Point, die snRNPs (U1, U2, U4, U5 und U6) und das Pyrimidin-Trakt-Bindeprotein (U2AF). Zusammen mit dem Ribonukleoprotein-Megapartikel führt das Spleißosom zwei Umesterungen durch, bei dem die Intronsequenz entfernt und die Exone zusammengeführt werden (Abb. 1-1).

Neben U2AF existiert noch ein weiteres RNA-bindendes Protein (PUF60), das an den Pyrimidin-Trakt der pre-mRNA binden kann. PUF60 stimuliert das Spleißen bei Transkripten mit labilen 3`Spleißstellen. Beide Proteine haben ihre Funktion in der Erkennung von 3`Spleißstellen. PUF60 ist es möglich, auch in Abwesenheit von U2AF, das Spleißen zu aktivieren. Das Expressionslevel beider Proteine kann den alternativen Spleißprozess beeinflussen. PUF60 ist darüber hinaus in der Lage an Proteine u.a. an SC35, einem Vertreter der SR-Familie, zu binden [Hastings et al. 2007]. Als Bestandteil des Spleißosoms ist PUF60 mit der 17S U2 snRNP assoziiert [Will et al. 2002].

1.1.2 Alternatives Spleißen

Der Unterschied zwischen dem konstitutiven und alternativen Spleißen liegt meist in der Beschaffenheit der Spleißstellen. Starke Spleißstellen werden konstitutiv gespleißt. Spleißstellen (5`->3`), die von der Konsensus Sequenz (GT-AG) abweichen, wie GC-AG, GG-AG, GT-TG, GT-CG, AT-AG, GA-AG, GT-AC und CT-AG, werden als labil bezeichnet und alternativ gespleißt [Burset et al. 2000, Jackson et al. 1991]. Rund 95 % der humanen Gene durchlaufen den alternativen Spleißprozess [Pan et al. 2008]. Die jeweilige Position von starken und labilen Spleißstellen ermöglicht die große Vielfalt des alternativen Spleißens, wie z.B. den Einschluss von alternativen Exons, die Verwendung von alternativen 5`- bzw. 3`-Spleißstellen, Exon Skipping oder die Entstehung von alternativen Introns [Kornblihtt et al. 2013].

Die Regulation von labilen Spleißstellen wird durch *cis-regulatory sequences* und *trans-acting factors* reguliert. Zu den *cis-regulatory sequences* gehören die *exonic splicing enhancer* (ESEs), welche aus degenerierten Sequenzen von 6-8 Nukleotiden bestehen. An diese können regulatorische Spleißproteine (*trans-acting factors*) binden. Dadurch wird das

Spleißen durch ESEs verstärkt [Blencowe et al. 2000]. Ebenfalls zu den *cis-regulatory sequences* gehören die *exonic splicing silencer* (ESSs), welche den Spleißprozess supprimieren, sowie die *intronic splicing enhancer* (ISEs) und die *intronic splicing silencer* (ISSs).

Trans-acting factors haben die Möglichkeit, an *splicing enhancer und – silencer* zu binden (Abb. 1-2). Zu solchen Faktoren gehören Proteine der Ser/Arg-reichen (SR) und der heteronukleären Ribonukleinpartikel (hnRNPs) Protein-Familien. Auch gewebsspezifische Faktoren spielen in der Regulation des alternativen Spleißens eine Rolle [Kafasla et al. 2012].

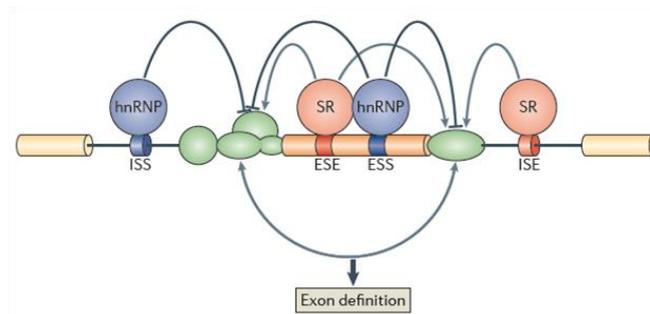


Abb. 1-2: Alternierende Spleißsequenzen und Faktoren

Interaktion von *cis-regulatory sequences* (ESEs, ESSs, ISEs, ISSs) mit *trans-acting factors* (SR-Proteine und hnRNPs) mit den Komponenten des Spleißosoms (grün). Dieses interagiert mit den 5'- und 3'-Spleißstellen. Aktivierende bzw. hemmende Einflüsse der involvierten Faktoren bestimmen die Definition des Exons. [Kornblihtt et al. 2013]

Ein Vertreter der hnRNPs ist das hnRNP-C. hnRNPs sind eine wichtige Unterklasse der Ribonukleoproteine (RNPs). Diese haben die Fähigkeit, an U-reiche Sequenzen der RNA zu binden [Dreyfuss et al. 1993]. Mehrere hnRNPs können eine pre-mRNA während der Transkription gleichzeitig binden, wodurch ein RNA-Protein-Komplex gebildet wird. König et al. (2010) konnten zeigen, dass hnRNPs im Kern an die pre-mRNA assoziiert vorliegen und die Prozessierung der pre-mRNA beeinflussen. hnRNP-C ist Bestandteil des Spleißosoms [Jurica und Moore et al. 2003] und unter normalen Bedingungen im Nukleoplasma lokalisiert [Lee et al. 2010]. Es beinhaltet eine Sequenz, die es erlaubt, mRNAs vom Kern ins Zytoplasma zu transportieren. Weitere Funktionen von hnRNP-C sind die Verpackung der mRNA, die Regulation der mRNA-Stabilität und des Spleißens [Krecic und Swanson 1999]. Nach einem DNA-Schaden sind RNPs wichtige regulatorische Proteine bei der Zellantwort. Nach IR-Bestrahlung induziert hnRNP-C den Apoptose-Pathway und ist somit an der Koordination der Zellantwort beteiligt [Christian et al. 2008].

1.1.3 Zusammenhang zwischen alternativem Spleißen und Krankheitsentstehung

Alternatives Spleißen humaner Gene kann zum Entstehen von Krankheiten führen. Dabei spielen Mutationen in regulatorischen Sequenzen der mRNA eine wichtige Rolle. Diese beeinträchtigen den alternativen Spleißprozess und können zu Erbkrankheiten und Krebs führen. Man unterscheidet Mutationen der *cis-regulatory sequences* und der *trans-acting factors*.

Die Spinale Muskelatrophie (SMA) ist ein Beispiel der ersten Gruppe (Mutation der *cis-regulatory sequence*). Das SMN1 Gen ist das für die spinale Muskelatrophie bestimmende Gen. Es existiert noch ein zweites Gen, das SMN2, welches sich allein durch eine stille Mutation (C > T) unterscheidet. Diese Mutation führt zum alternativen Spleißen von Exon 7 und einem verkürzten, instabilen SMN2-Protein [Vitte et al. 2007]. Die Anzahl der vorliegenden Kopien der SMN1 und SMN2 Gene ist entscheidend für den Krankheitsverlauf [Gavrilov et al. 1998, Wirth et al. 2002].

Ein Beispiel für die zweite Gruppe bildet der *trans-acting factor* SRSF1. Mutationen in diesem Gen führen zu dessen Überexpression. SRSF1 ist ein Vertreter der SR-Familie mit Funktion im konstitutiven und alternativen Spleißen, *nonsense-mediated mRNA-decay* (NMD), mRNA-Export und Translation [Zhang und Krainer 2004, Huang et al. 2003, Sanford et al. 2004]. In verschiedenen Brustkrebszelllinien ist SRSF1 überexprimiert bzw. bei Patientinnen mit einer schlechteren Überlebensprognose erhöht exprimiert [Anczukow et al. 2012]. Folglich kann die Expressionsrate eines Spleißproteins durch Mutationen beeinflusst werden, was wiederum Bedeutung im Krankheitsverlauf haben kann.

1.1.4 *Nonsense-mediated mRNA-decay* (NMD)

Der *nonsense-mediated mRNA-decay* gehört zu den Kontrollmechanismen der Zelle, die aberrant bzw. alternativ gespleißte mRNAs mit einem vorzeitigen Stoppkodon (PTC) erkennen und abbauen. PTCs entstehen durch Keimbahn- bzw. somatische Mutationen, Fehler in der Transkription oder posttranskriptionellen Prozessierung und durch Leserahmenverschiebung. Durch den NMD wird die Bildung potentiell toxischer Proteine verhindert. Des Weiteren kann die Halbwertszeit von mRNAs beeinflusst werden. Die

Verlängerung bzw. Verkürzung der Halbwertszeit dient der Regulation funktioneller Proteine [Neu-Yilik et al. 2008, Silva et al. 2009].

Der NMD ist mit der Translation verbunden [Maquat et al. 2010]. Substrate des NMD besitzen meist ein vorzeitiges Stoppkodon (PTC), das mehr als 50-55 Nukleotide vor der nächsten regulären Exon-Exon-Grenze liegt. Solche Substrate sind in humanen Zellen vorwiegend neusynthetisierte mRNAs. Die Transkription der mRNAs findet im Zellkern statt. Fertig synthetisierte mRNAs besitzen am 5` eine Cap-Struktur und am 3` ein Poly(A)-Schwanz. Die mRNA-Transkription, -Prozessierung und der Export ins Zytoplasma wird durch die Polymerase-II koordiniert. Der Export vom Kern ins Zytoplasma wird zusätzlich durch Exon-Junction-Komplexe (EJC) gesteuert. Die EJCs markieren die mRNAs nicht nur für den Kern-Export, sondern auch für die Translation und den NMD.

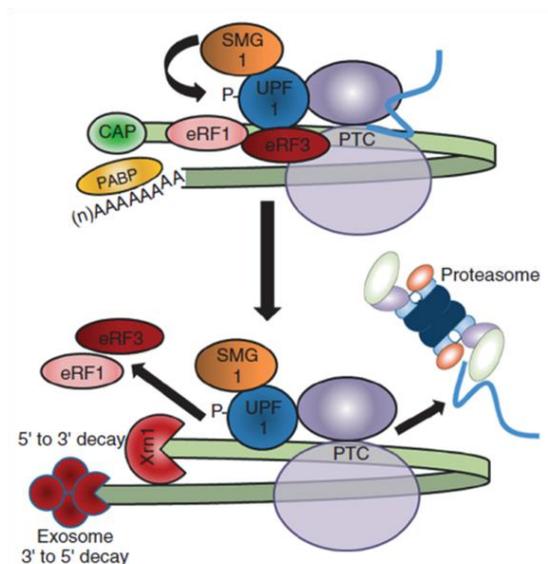


Abb. 1-3: Nonsense-mediated mRNA-decay

Durch die Anwesenheit eines vorzeitigen Stoppcodons (PTC) in der mRNA wird der NMD aktiviert. Die verminderte Interaktion zwischen dem PABP und Upf1, während das Ribosom das PTC erreicht, resultiert in der Phosphorylierung von Upf1 durch SMG-1. Upf1 rekrutiert das Proteasom, welches das verkürzte Protein abbaut. Ebenfalls rekrutiert werden das Exosom und Xrn1, welche den Abbau der übrigen mRNA von 5´->3´ bzw. 3´->5´ vermitteln [verändert nach Brooks, 2010].

Im Zytoplasma durchlaufen die mRNAs eine sogenannte „Pioneer Round“ der Translation, welche durch das Cap-Bindeprotein (CBP) initiiert wird. Dabei werden Proteine, die noch an der mRNA assoziiert sind, entfernt und zurück in den Zellkern importiert. Die Initiation der Translation wird durch das 5`-Cap und den 3`-Poly(A)-Schwanz reguliert. Das 5`-Cap kann an die 40S Untereinheit der Ribosomen binden. Der 3`-Poly(A)-Schwanz interagiert mit dem

Poly(A)-Bindepotein (PABP). Das PABP ist an eIFG4 assoziiert. Dieses kann über die Bindung an weitere eIF-Faktoren an die 5`-Cap Struktur binden. Diese zirkulierende mRNA stimuliert die Translation [Sonenberg et al. 2009]. Während dieser ersten Translationsrunde werden mRNAs mit PTC als NMD Substrate erkannt. Die Anwesenheit von EJC's *downstream* des PTCs verbessert die NMD-Aktivität. Der NMD wird durch antagonistische Signale zwischen Upf1 und PABP bei der Termination der Translation reguliert (Abb. 1-3). Wenn die Verbindung zwischen dem PABP und dem Terminations-Komplex nicht favorisiert wird, kommt es zur Phosphorylierung des Upf1 durch SMG-1. Diese verbleiben am Terminations-Komplex und lösen den NMD aus [Kuroha et al. 2009]. Die mRNAs werden durch den 5` -> 3` Xrn1 und den 3` -> 5` Exosom-vermittelten Abbauweg degradiert. Über diese beiden Mechanismen werden alle mRNAs, die nicht translatiert werden, abgebaut [Parker et al. 2007].

Upf1 bildet zusammen mit Upf2 und Upf3 den wichtigsten Teil der NMD-Maschinerie. SMG-1, -5, -6 und -7 sind Proteine, die die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Upf1 vermitteln [Wilkinson et al. 2003]. Upf1 ist primär ein zytoplasmatisches Protein mit der Hauptfunktion im NMD. Es besitzt aber nukleäre Lokalisations- und Export-Sequenzen, die einen Transport vom Kern ins Zytoplasma und zurück ermöglichen [Mendell et al. 2002]. In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass Upf1-Null Mäuse bereits an Tag 7,5 verstarben. Daher wird vermutet, dass der NMD für das humane Zellüberleben essentiell ist [Medghalchi et al. 2001].

1.2 p53

1.2.1 Struktur und Funktion

P53 wurde im Jahr 1979 zufällig aufgrund der Interaktion mit dem onkogenen T-Antigen SV40 entdeckt [De Leo et al. 1979, Lane und Crawford 1979, Linzer und Levine 1979]. Keimbahnmutationen im humanen p53-Gen stellen ein erhöhtes Risiko dar, Tumore zu entwickeln (Li-Fraumeni-Syndrom). Es konnte gezeigt werden, dass sich p53-Knockout-Mäuse normal entwickeln, aber häufig spontan Tumore bilden [Donehower et al. 1992]. Dies zeigt, dass das p53-Protein im normalen Wachstums- und Entwicklungsprozess der Zelle nicht benötigt wird. Dafür wird ihm eine Schutzfunktion in der Tumorentstehung

zugeordnet, da es das Wachstum potentieller Tumorzellen inhibieren kann. Darüber hinaus ist p53 in über 50 % aller Tumoren entweder mutiert oder weist einen Verlust des Gens auf [Hollstein et al. 1991]. Es hat ebenso eine Funktion in der Kontrolle von Zellzyklus und Zellüberleben als Antwort auf Stress, wie z.B. bei DNA-Schäden und Hypoxie [Lane et al. 1992, Levine et al. 1997].

Das Gen ist auf Chromosom 17p13.1 lokalisiert. Es kodiert für ein Protein bestehend aus 393 Aminosäuren (53 kDa). P53 enthält 5 Domänen und ein Kernlokalisierungssignal. Die prolinreiche Domäne (PRD) weist eine in fünf Kopien vorliegende PXXP Sequenz auf, die an SH3-Domänen binden kann. Die SH3 Domäne (Src homologe 3 Domäne) ist eine konservierte Sequenz, die im nichtkatalytischen Teil der zytoplasmatischen Tyrosinkinase (Src, Ab1) zu finden ist. Demzufolge spielt die PRD eine wichtige Rolle bei der durch p53 vermittelten Apoptose [Sakamuro et al. 1997]. Die Tetramerisierungsdomäne (4D) ist entscheidend bei der Bildung von funktionsfähigem p53. Nur als Tetramer kann p53 an die DNA binden und als Transkriptionsfaktor wirken [Hainaut et al. 1994]. Über die Transaktivierungsdomäne (TAD) liegt p53 an MDM2 gebunden vor.

Die Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 ist ein entscheidender Schritt in der Tumorentstehung. Mutationen im p53-Gen liegen vorwiegend nahe der DNA-Bindedomäne. Über 50 % der bekannten somatischen Mutationen sind Missense-Mutationen. Zwei-Drittel der Missense-Mutationen befinden sich in der DNA-Bindedomäne, wodurch p53 die Transkription von Zielgenen nicht mehr aktivieren kann [Hollstein et al. 1991]. Die Missense-Mutationen verhindern die sequenzspezifische p53-Bindung an spezielle Konsensussequenzen [El-Deiry et al. 1992]. Somit kommt es zur Inhibierung der Apoptose. Mutiertes p53 (mt-p53) verliert nicht nur die Eigenschaften von wt-p53, sondern gewinnt durch Überexpression onkogene Eigenschaften hinzu [Strano et al. 2007]. Darüber hinaus hat mt-p53 eine längere Halbwertszeit (1-24 h) gegenüber wt-p53 (6-20 min.) [Sigal und Rotter, 2000]. In „knock-in“ Experimenten der Maus wurde gezeigt, dass mt-p53 Protein in normalen Zellen instabil ist [Lang et al. 2004]. Aufgrund dessen wird vermutet, dass die lange Halbwertszeit von mutiertem p53 auf die physiologischen und chemischen Faktoren im Tumor zurückzuführen ist. Die ungewöhnlich große Zeitspanne der Halbwertszeit von mt-p53 könnte ebenso abhängig von der ineffizienten E3-Ligase-Aktivität von MDM2 sein. MDM2 wird in wt-p53 Zellen transkriptionell aktiviert. In Zellen mit mt-p53 wird die Aktivität von MDM2 beeinträchtigt [Haupt et al. 1997]. Zellulärer Stress führt zur Affinitätsreduktion

zwischen p53 und MDM2 und somit zur Aktivierung von p53. Die Reste Serin 15 und 20 werden bevorzugt durch ATM und Chk2 phosphoryliert, was u.a. eine Bindung von p300 induzieren kann. p300 ist ein Transkriptions-Co-Aktivator, der die Acetylierung der C-terminalen Domäne von p53 induziert und es dadurch stabilisiert und aktiviert. Unter diesen Voraussetzungen kann p53 auf DNA-Schäden reagieren, indem es als Transkriptionsfaktor verschiedene Zielgene aktiviert, die den Zellzyklusarrest, die Apoptose, die Seneszenz und DNA-Reparaturmechanismen induzieren [Toledo und Wahl, 2006].

Zusätzlich kann p53 auch durch Onkogene angeregt werden. Die Stimulation führt zur Aktivierung des ATM/ATR-Pathways, wodurch p53 phosphoryliert wird. Eine weitere Möglichkeit liegt in der Bindung von ARF an die saure Domäne von MDM2. Dadurch wird die Ubiquitylierung von p53 inhibiert und p53 stabilisiert [Midgley et al. 2000]. Gewiss eine der wichtigsten Funktionen von p53 ist die Induktion der Apoptose. p53 kann dies direkt über die Interaktion der DBD mit BclX oder indirekt über die Aktivierung der Transkription apoptoseinduzierender Gene anregen [Moll et al. 2005]. In Zellen mit mt-p53 kann Apoptose nicht über p53 induziert werden, da solche Mutationen oftmals in der DBD auftreten, was zum Verlust der transkriptionellen Aktivität von p53 führt. Die Zelle kann auf zellulären Stress nicht adäquat reagieren. Es kommt zum unkontrollierten Zellwachstum und zur Ausbreitung des Tumors.

1.2.2 Regulation von p53 durch die onkogenen Proteine MDMX und MDM2

MDMX und MDM2 sind Proteinbindungspartner von p53. MDM2 kann p53 über deren E3-Ligase Aktivität der RING-Domäne ubiquitylieren und für den proteasomalen Abbau vorbereiten [Haupt et al. 1997]. Eine Punktmutation in der RING-Domäne von MDM2 führt, genauso wie ein MDM2-Knockout, im Mausexperiment zum p53-abhängigen Tod [Itahana et al. 2007]. Die MDMX-vermittelte p53-Inhibierung kann MDM2-abhängig und -unabhängig sein [Xiong et al. 2006]. MDM2 reguliert p53 hauptsächlich über die Ubiquitylierung und den anschließenden Proteinabbau. Die MDMX-vermittelte Regulation von p53 geschieht primär durch die Regulation dessen transkriptioneller Aktivität [Francoz et al. 2006]. Des Weiteren können MDMX und MDM2 über deren RING-Domänen Heterodimere bilden [Tanimura et al. 1999]. MDMX fördert die MDM2-vermittelte p53 Ubiquitylierung und den Abbau durch die Interaktion der RING-RING-Domänen *in vitro* [Gu et al. 2002]. MDM2-

Homodimere führen zur Monoubiquitinylierung von p53 an verschiedenen Aminosäureresten. Dagegen kann p53 durch MDM2/MDMX-Heterodimere stabil polyubiquitinyliert werden. MDMX ist somit ein essentieller Aktivator von MDM2 bei der Polyubiquitinylierung von p53 [Wang et al. 2011]. In Mausexperimenten konnte ebenso wie für MDM2 gezeigt werden, dass eine Punktmutation in der RING-Domäne von MDMX sowie ein MDMX-Knockout zum p53-vermittelten Tod am Tag 9,5 der Embryogenese führte. Zu beobachten war ein Anstieg der Proteinlevel von p53, p21, bax und MDM2. Die Reduzierung des Proteinlevels von p53 auf 15 % des Normalen sicherte das Überleben der Embryonen. Bei Unterschreitung des basalen p53 Proteinlevels ist p53 nicht länger Substrat der durch die MDM2/MDMX-Heterodimer vermittelte Ubiquitinylierung [Huang et al. 2011, Pant et al. 2011]. MDMX und p53 sind damit Konkurrenten in der MDM2/MDMX-vermittelten Ubiquitinylierung. In p53-Null Zellen wird MDMX effizient durch die MDM2/MDMX-Heterodimere ubiquitinyliert. Im Vergleich dazu ist in wt-p53 Zellen p53 das primäre Substrat der Ubiquitinylierung. Überschreiten MDMX-Monomere ein bestimmtes Proteinlevel, konkurrieren p53 und MDMX um die Polyubiquitinylierung durch die MDM2/MDMX-Heterodimere *in vitro*. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass dies zur p53-Stabilisierung führt. In den meisten Krebszelllinien ist allerdings ein erhöhter MDMX-Proteinlevel zu beobachten, was primär zur Ubiquitinylierung und zum Abbau von MDMX führt. Dies hat in wt-p53 Zellen die Stabilisierung von p53 zur Folge [Wang et al. 2011]. Die p53-vermittelte Aktivierung der Transkription wäre somit nicht beeinflusst. Das nach DNA-Schäden auftretende erhöhte aberrante bzw. alternative Spleißen der MDMX-mRNA führt zur verminderten Expression der full-length MDMX-mRNA und damit zur Reduktion des MDMX-Proteinlevels. Infolgedessen könnte p53 destabilisiert und damit die p53-vermittelten Zellantwort inhibiert werden.

1.3 MDMX

1.3.1 Struktur und Funktion

MDMX wurde erstmals 1996 durch Shvarts et al. als bis dahin unbekanntes Bindeprotein von p53 beschrieben. Strukturell weist es große Homologien zum Onkogen MDM2 auf, weshalb es MDMX genannt wurde (Abb. 1-4). Das Gen ist auf Chromosom 1q32 lokalisiert. MDMX, auch MDM4 genannt, kodiert für 490 Aminosäuren und bildet ein 80 kDa großes Protein. Es besitzt eine p53-Bindedomäne (BD), eine saure Domäne, ein Zink-Finger-Motiv sowie eine

RING-Finger-Domäne. Die p53-Bindedomäne enthält eine konservierte Sequenz (AS 18-101), die eine sehr große Homologie zu MDM2 aufweist. Über die RING-Finger-Domänen können MDM2 und MDMX stabile Heterodimere bilden. Bei MDM2 fungiert die RING-Finger-Domäne zusätzlich als E3-Ubiquitin-Ligase. Ebenfalls fehlen MDMX im Vergleich zu MDM2 das Kernexportsignal (NES) und das Kernlokalisierungssignal (NLS). Dies zeigt, dass MDMX nur im Komplex mit einem anderen Protein aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert werden kann.

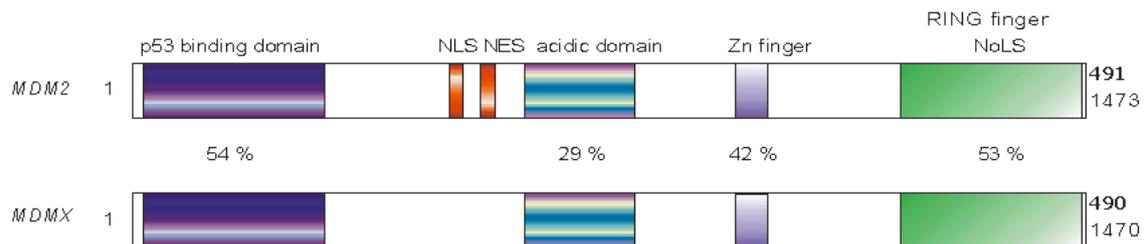


Abb. 1-4: Vergleich der Strukturen von MDM2 und MDMX

Die p53-Bindedomäne und die RING-Finger-Domäne enthalten konservierte Sequenzen. Das nukleoläre Lokalisationssignal (NoLS) von MDM2 befindet sich ebenso in der RING-Finger-Domäne von MDMX. Die Prozentzahlen stellen die Übereinstimmung der einzelnen Domänen des MDM2- und MDMX-Proteins dar. (modifiziert nach [Marine und Jochemsen, 2004])

Tanimura et al. (1999) konnten zeigen, dass Heterodimere aus MDMX und MDM2 stabiler sind als Homodimere. Diese Erkenntnis deutete darauf hin, dass MDMX eine regulierende Funktion im p53-MDM2-Zusammenspiel hat. Es ist im Komplex mit MDM2 aktiv, was zur Folge hat, dass es die Autoubiquitylierung von MDM2 stimuliert, aber auch selbst ein Substrat der Ubiquitylierung von MDM2 ist. Ähnlich wie MDM2 führt die Überexpression von MDMX zur Inhibierung der p53-vermittelte Transkription [Shvarts et al. 1996]. MDMX kann die MDM2-E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität stimulieren, um so das p53-Level unter normalen Wachstumsbedingungen zu reduzieren [Linares et al. 2003].

Bei MDMX-Knockout Experimenten starben die Embryonen zwischen Tag 7,5 und 8,5. Induziert wurde die Letalität durch Zellzyklusarrest und nicht, wie bei MDM2, durch Apoptose [Parant et al. 2001]. Dies deutet darauf hin, dass p53 durch MDM2 und MDMX unterschiedlich reguliert werden kann. In beiden Fällen konnte die letale Wirkung durch einen p53-Knockout aufgehoben werden. Lozano und Huang (2011) konnten zeigen, dass eine Punktmutation bzw. die Deletion der RING-Finger-Domäne zum embryonalen Tod am Tag 9,5 im Mausexperiment führte. Dieser Effekt wurde durch einen Anstieg von p53

begleitet. Die Reduktion des p53-Levels führte zum Überleben der Mausembryonen. Die zelluläre Stabilität und Lokalisierung von MDMX wird durch MDM2 reguliert. Die Co-Expression mit MDM2 stimuliert den Transport von MDMX in den Zellkern. Dieser Vorgang ist p53-unabhängig, benötigt aber eine intakte RING-Finger-Domäne in beiden Proteinen, sowie ein intaktes NLS von MDM2 [Migliorini et al. 2002].

Das Gefüge zwischen den Proteinen MDM2, MDMX und p53 ist entscheidend bei der Regulation der p53-vermittelten Zellantwort.

1.3.2 Spleißvarianten von MDMX

Von MDMX sind bereits einige Spleißvarianten beschrieben worden [Rallapalli et al. 1999, de Graaf et al. 2003, Chandler et al. 2006]. Eine Auswahl der am häufigsten beschriebenen MDMX-Isoformen ist in Abbildung 1-5 dargestellt.

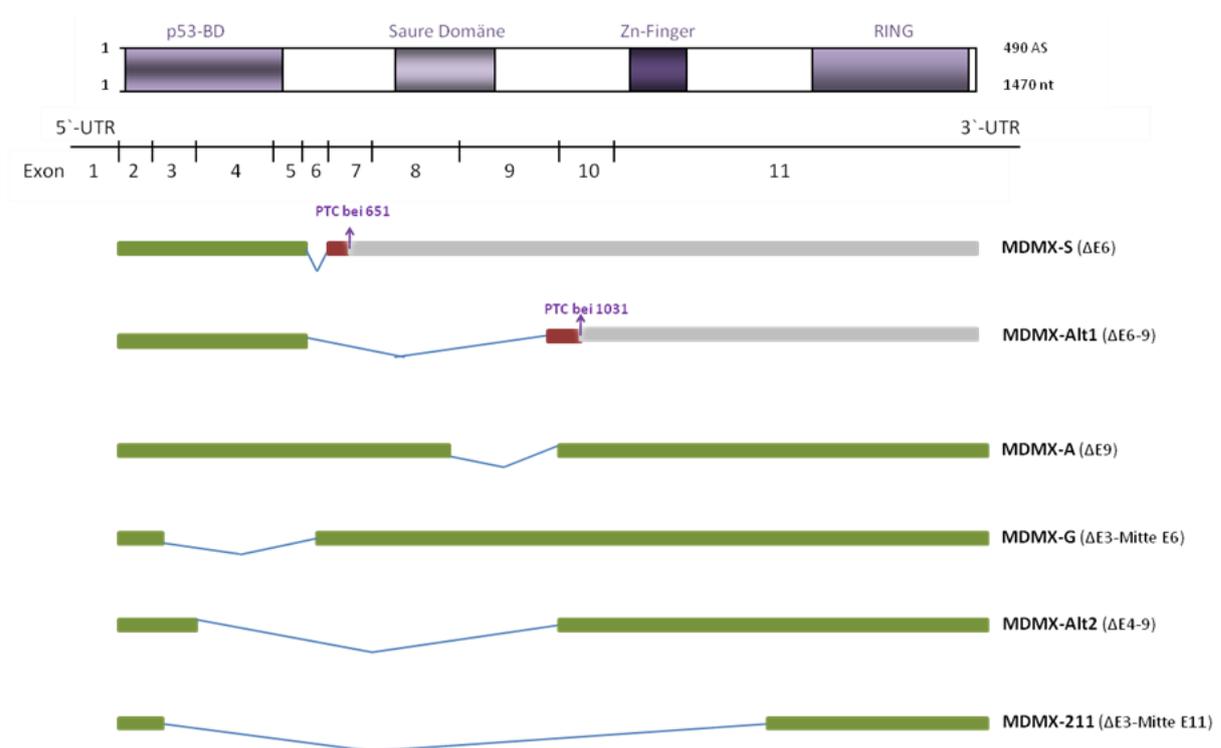


Abb. 1-5: Strukturelle Darstellung bekannter MDMX-Isoformen im Vergleich zum „full-length“-MDMX
 In grün dargestellt sind solche mRNA-Sequenzen, die im Vergleich zur „full-length“-Sequenz unverändert sind. Eine durch Leserahmenverschiebung erzeugte Abweichung der Aminosäuresequenz ist rot markiert. Die in grau dargestellte Sequenz wird durch ein vorzeitig entstandenes Stoppcodon (PTC) nicht mehr translatiert.

Die Isoformen MDMX-S und MDMX-Alt1 besitzen ausschließlich die p53-Bindedomäne (p53-BD). MDMX-A hat zusätzlich noch eine intakte Zn-Finger- und RING-Domäne. MDMX-G, -Alt2 und -211 haben durch den Verlust der p53-BD nicht die Möglichkeit, an p53 zu binden. Die Isoform MDMX-G besteht stattdessen aus der sauren Domäne, der Zn-Finger- und RING-Domäne. Im Vergleich zur Spleißvariante MDMX-G fehlt der Isoform MDMX-Alt2 zusätzlich die saure Domäne. MDMX-211 besitzt ausschließlich die RING-Domäne. Zusammengefasst haben Isoformen durch das Vorhandensein einzelner Domänen die Möglichkeit unterschiedlich in der Zelle auf Veränderungen zu reagieren.

Die bisher bedeutendste MDMX-Isoform ist MDMX-S. Dieser Spleißvariante ist Exon 6 alternativ herausgespleißt, was zu einem Verlust von 68 bp führt. Es kommt zur Verschiebung des Leserahmens und zur Bildung eines vorzeitigen Stoppkodons im Exon 7. Das MDMX-S-Protein kodiert für 127 Aminosäuren und besteht nur aus der p53-BD, wodurch es die Möglichkeit erhält, an p53 zu binden und die p53-vermittelte Genexpression zu blockieren [Rallapalli et al. 1999]. Von besonderer Bedeutung ist das Verhältnis der mRNAs von MDMX-S zu full-length-MDMX (FL-MDMX). In verschiedenen Tumorgeweben korreliert das Verhältnis von MDMX-S/FL-MDMX größer eins mit einem schlechteren Gesamtüberleben dieser Patienten [Rallapalli et al. 1999, Bartel et al. 2006, Jochemsen et al. 2011, Liu et al. 2012]. Demzufolge ist das Verhältnis dieser mRNAs ein negativer prognostischer Marker [Bartel et al. 2006, Lenos et al. 2012].

1.3.3 Bedeutung von MDMX in der Krebsentstehung und -therapie

MDMX ist neben MDM2 einer der bedeutendsten negativen Regulatoren von p53. Die Blockierung der p53-abhängigen Transkription zählt zu dem wesentlichsten Ereignis in der Tumorentstehung [Biegging und Attardi, 2012]. MDMX ist ein wichtiger Inhibitor der transkriptionellen Aktivität von p53 [Marine und Jochemsen 2005]. Darüber hinaus kann MDMX über dessen p53-sensitiven Promotor transkriptionell von p53 reguliert werden. Über diesen entsteht ein um 18 Aminosäuren vergrößertes Protein [Phillips et al. 2010]. Bisher konnte nicht gezeigt werden, ob andere gewebsspezifische Faktoren diesen Promotor nutzen, um MDMX transkriptionell zu regulieren und so auf diese Weise Einfluss auf die Tumorentstehung zu nehmen.

Ein möglicher Ansatz für die Krebstherapie ist die Regulation der posttranskriptionellen Modifikation von MDMX. Es konnten bereits verschiedene Kinasen identifiziert werden, die sowohl MDMX, als auch MDM2 modifizieren und dadurch einen inhibierenden bzw. aktivierenden Effekt auf p53 ausüben (Abb. 1-6). Ein Beispiel ist die Phosphorylierung der Kinasen *ataxia-telangiectasia mutated* (ATM) und CHK nach DNA-Schäden. Diese phosphorylieren mehrere Serinreste nahe der RING-Domäne von MDMX und MDM2 [Meek und Hupp, 2010]. Die RING-Domäne beider Proteine ist wichtig für die Heterodimerbildung und eine damit verbundene stabile Polyubiquitynylierung von p53 [Wang et al. 2011]. Durch die Modifikationen in den RING-Domänen kann es zur Dissoziation der Oligomere bzw. zur Destabilisierung von MDMX und MDM2 kommen [Chen et al. 2005, Pereg et al. 2006]. Die *downstream* Effekte und die damit verbundene Regulation von p53 sind gewebsspezifisch. Es ist gezeigt worden, dass die Dephosphorylierung dieser Serinreste zur Inhibierung von p53 führt [Jackson et al. 2011].

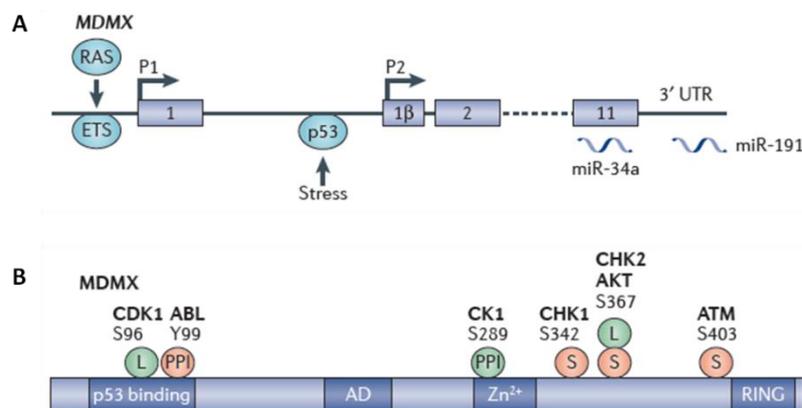


Abb. 1-6: Transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation von MDMX

A zeigt die transkriptionelle Regulation. Das erste kodierende Exon ist Exon 2. Es existiert im Intron 1 ein zusätzliches Exon (1β), welches ein ATG trägt und die Möglichkeit eines längeren Proteins (MDMX-L) birgt. In ungestressten Zellen wird der P1-Promotor für die Transkription verwendet. Nach p53 Aktivierung wird der P2-Promotor transkriptionell genutzt. Die microRNAs-34a und -191 sind dargestellt, da diese die Translation blockieren können. In **B** sind posttranskriptionelle Modifikationen dargestellt, die zum einen die Möglichkeit an p53 zu binden beeinflussen, sowie die Bindung an MDM2 verhindert bzw. die Interaktion mit anderen Proteinen beeinflusst, weshalb die Stabilität von MDMX und p53 nicht gewährleistet wird. In grün dargestellt sind die Modifikationen, die eine MDMX-abhängigen Inhibierung von p53 verstärken und in rot, die diese inhibieren. [Wade, Li and Wahl 2013]

MDMX und MDM2 können ebenfalls über microRNAs reguliert werden. Es ist gezeigt worden, dass MDMX und MDM2 durch p53 induzierte miRNAs herunterreguliert werden können [Lin et al. 2012, Lujambio und Lowe 2012]. Ein Beispiel für MDMX ist die miRNA-34a. Die Zielsequenz liegt in Exon 11 der MDMX-mRNA. Die Bindung wird beeinflusst durch das

Vorhandensein eines *single nucleotid polymorphism* (SNP), bei dem das C-Allel die Bindung stört [Mandke et al. 2012]. Die Möglichkeit der Bindung solcher miRNAs, in Abhängigkeit der Anwesenheit von SNPs, führt zur Stabilisierung oder zum Abbau der MDMX- bzw. MDM2-mRNA. Auf diese Weise kann die MDM2/MDMX-Menge reguliert werden. Dies hat wiederum Einfluss auf die Stabilität von p53 und somit auf die Zellantwort.

Proliferierende Zellen sind im Vergleich zu ruhenden Zellen sensitiver beim Abbau von MDM2 und MDMX [Francoz et al. 2006]. Aufgrund dessen konnte eine Verbindung zwischen mitogenen Signalwegen und den MDM-Proteinen hergestellt werden. In Mausexperimenten wurde die Aktivität von MYC, einem bekannten Mitogen und Onkogen, in Abhängigkeit von funktionellem MDM2 und MDMX überprüft. Es zeigte sich in MDM2^{+/-} und MDMX^{+/-} - Mäusen eine verringerte Rate an MYC-induzierten Lymphomen [Terzian et al. 2007]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass MYC und MDM2 oder MDMX während der Tumorentstehung zusammenarbeiten könnten. De Clercq et al. (2010) konnten zeigen, dass das MDMX-Level in B-Zellen erhöht ist, die MYC vor der Tumorentstehung überexprimieren. Ob der Anstieg der MDMX-mRNA in B-Zellen in Abhängigkeit von MYC geschieht, ist noch unklar.

1.4 Wirkungsweise von Zytostatika

1.4.1 Cisplatin

Cisplatin ist eine ladungsneutrale Verbindung aus je zwei Aminogruppen und Chloridionen, die an Platin(II) koordiniert sind. Es kann über passive Diffusion oder aktiven Membrantransport in die Zelle gelangen. Beim aktiven Transport wird Cisplatin über Ctr1 (Copper Transporter 1) oder Oct2 (organ. Kationen Transporter 2) in die Zelle transportiert [Ishida et al. 2002, Ciarimboli et al. 2005]. Durch hydrolytische Spaltung werden die Chloride gegen Wassermoleküle im Zytoplasma ausgetauscht. Cisplatin bindet über das N-7 des Imidazolringes der Purine Guanin bzw. Adenin an die DNA. Die Bindung von Cisplatin an die DNA führt zur Bildung von inter- und intrastrang DNA-Produkten, wobei letztere am häufigsten auftreten. Intrastrang DNA-Produkte zweier Guanine treten in 47-50 % und eines Guanins mit einem Adenin in 23-28 % der Fälle auf. Die Bildung von interstrang DNA-Produkten zwischen zwei Guaninen findet nach Cisplatin Behandlung nur zu 8-10 % statt [Jamieson et al. 1999]. Es kommt zur Blockierung der Replikation und Translation, wodurch das *ataxia*

telangiectasia rad3 related-Protein (ATR) aktiviert wird. ATR kann p53 phosphorylieren, woraufhin p53 in der Lage ist verschiedene Wege der Zellantwort zu aktivieren [Crighton und Ryan, 2004].

Die Behandlung von Tumoren mit Chemotherapeutika führt oftmals zur Ausbildung von Resistenzen. Die Resistenzbildung durch platinhaltige Chemotherapeutika ist bei der Behandlung, z.B. des Ovarialkarzinoms, ein Problem. Kelland et al. (2007) konnten einige Strategien der Zelle beschreiben, die zur Resistenzbildung führen. Eine geringere Aufnahme solcher Zytostatika durch die Membran, eine verstärkte Aktivität von DNA-Reparaturmechanismen und ein Anstieg der Toleranz gegenüber DNA-Schäden zählten zu den wichtigsten Mechanismen.

1.4.2 Camptothecin

Camptothecin besteht aus einem Indolizin-Chinolin-Skelett mit einem sechsgliedrigen Lactonring. Es ist ein Hemmer der DNA-Topoisomerase-I [Hsiang and Liu 1988]. Topoisomerasen (Typ 1) spalten einen DNA-Strang durch Bildung eines Tyrosin-Phosphatesters. Dadurch entspannt sich die superhelikale Struktur der DNA [Wang et al. 1985]. Nach erfolgter Replikation und Transkription wird die Topoisomerase-I entfernt, und der Einzelstrangbruch repariert. Durch Bindung von Camptothecin an den DNA-Topoisomerase-I-Komplex wird der Wiederverschluss des zuvor erfolgten DNA-Einzelstrangbruchs verhindert [Hsiang et al. 1985]. Replikation und Transkription werden blockiert und der programmierte Zelltod eingeleitet.

1.5 Zelluläre Reaktion auf einen DNA-Schaden

1.5.1 Der DNA-Damage-Pathway

Ein DNA-Schaden zieht in der Zelle die Aktivierung verschiedener Wege der Stressantwort nach sich. Dies kann zum Arrest des Zellzyklus vor der Replikation (G1/S-Phase) bzw. vor der Zellteilung (G1/M-Phase) führen. An der so ausgelösten DNA-Damage Signalkaskade sind verschiedene Proteingruppen beteiligt. Die DNA-Damage Sensorproteine detektieren DNA-Doppelstrangbrüche [Lavin und Kozlov, 2007] und rekrutieren sowie aktivieren ATM und ATR

[Uziel et al. 2003, Cortez et al. 2001]. Unter Zuhilfenahme von Mediatorproteinen, welches z.B. BRCA1 für ATM ist, werden die Effektorproteinkinasen Chk1 und Chk2 aktiviert. Über diese Kinasen wird das DNA-Damage-Signal aus dem Kern exportiert. Substrate dieser Signalkaskade sind Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusregulatoren, Faktoren des Apoptosepathways bzw. der DNA-Reparatur [Harrison und Haber 2006, Harper und Elledge 2007, Lazzaro et al. 2009]. Die durch DNA-Strangbrüche ausgelöste Zellantwort führt zur Akkumulation von Proteinen, wie beispielsweise von γ H2AX, an den Bruchstellen [Rogakou und Sekeri-Pataryas, 1999]. Andere Proteine, wie die Effektorkinasen Chk1 und Chk2, werden an den geschädigten Stellen der DNA phosphoryliert, aber es erfolgt eine schnelle Dissoziation [Bartek und Lukas, 2003]. In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass ATM-Knockout-Mäuse weiterhin überlebensfähig sind, im Gegensatz dazu war der Knockout von ATR letal [Xu et al. 1996, Brown und Baltimore, 2000]. Somit ist, in Bezug auf das Überleben, nur ATR ein essentielles Protein der Zelle. Die Antwort auf verschiedenste DNA-Schäden wird sowohl durch ATM als auch durch ATR reguliert. Die durch diese beiden Kinasen ausgelösten Signalwege verlaufen parallel, aber nicht unabhängig voneinander [Stiff et al. 2006]. Die Hauptfunktion von ATR ist die Regulation des Eintritts der Zelle in die S-Phase. Dabei aktiviert ATR die Kinase Chk1. Diese phosphoryliert wiederum Cdc25A, was zum Abbau des Proteins führt. So wird in normalen Zellen die DNA-Replikation koordiniert. Bei Inhibierung von ATR kommt es zur Akkumulation von Cdc25A. Dadurch erfolgt eine erhöhte Initiation des Replikons, was zur Induktion von Doppelstrangbrüchen führt [Sorensen et al. 2003, Syljuasen et al. 2005]. Die aufeinander abgestimmte Aktivierung von ATR und ATM bei Doppelstrangbrüchen hat auch direkte Relevanz bei der Krebstherapie. Tumorzellen weisen oft Fehler beim Zellzyklus-Checkpoint auf, die oftmals einhergehen mit inaktivem p53 dieser Zellen. Inaktives p53 kann durch Mutationen im p53-Gen entstehen. Beispielsweise kann nach Bestrahlung in Tumorzellen mit inaktivem mt-p53 der G1/S-Checkpoint nicht mehr aktiviert werden. Solche Tumorzellen nutzen die ATM-abhängige Aktivierung von ATR zum Eintritt in die S-Phase. Damit ist die Inhibierung von ATR ein Ansatzpunkt zur Verminderung der Replikation und des Überlebens von Tumorzellen und daher eine mögliche Strategie in der Krebstherapie nach Bestrahlung [Hurley und Bunz 2007].

Die Kinasen ATM und ATR sind somit zentrale Proteine bei der Weiterleitung der Signale nach einem DNA-Schaden (Abb. 1-7). Beide Kinasen phosphorylieren Serin 15 in der

Transaktivierungsdomäne von p53 in wt-p53 Zellen [Crichton und Ryan, 2004]. Durch Phosphorylierung von p53 wird die Bindung zwischen MDM2 und p53 aufgehoben, was zur Autodegradation von MDM2 führt. Die Regulierung von MDMX ist, wie unter 1.3.3 beschrieben, ein wichtiger Bestandteil in der p53-vermittelten Antwort auf DNA-Schäden. Zusammengefasst sind p53, MDM2 und MDMX ebenfalls wichtige Proteine im DNA-Damage-Pathway.

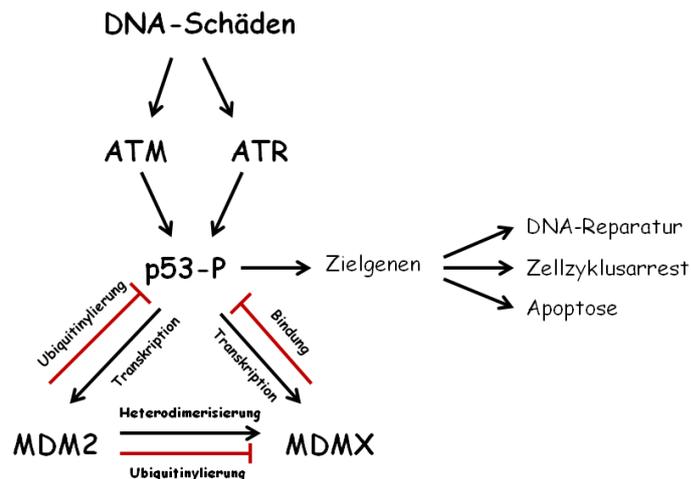


Abb.1-7: Zelluläre Reaktion auf DNA-Schäden

Nach DNA-Schäden kommt es zur Aktivierung der Kinasen ATM und ATR, die u.a. p53 phosphorylieren können. P53-P bildet die aktive tetramere Form und stimuliert als Transkriptionsfaktor Zielgene der DNA-Reparatur, des Zellzyklusarrest und der Apoptose. Gleichzeitig bildet sich ein konkurrierendes Gleichgewicht zwischen p53, MDM2 und MDMX aus.

1.5.2 Einfluss von DNA-Schäden auf das Spleißen

Darüber hinaus hat genotoxischer Stress Auswirkungen auf das Spleißen. Spleißproteine werden während der Transkription rekrutiert und binden an die durch RNA-Polymerase II (Pol II) neu entstehende pre-mRNA [Listermann und Neugebauer, 2006]. Alternatives Spleißen kann wiederum durch die Elongationsrate der Transkription beeinflusst werden [de la Mata et al. 2003]. Munoz et al. (2009) zeigten, dass UV-Bestrahlung die Pol II-vermittelte Elongation inhibiert, wodurch das alternative Spleißen beeinflusst wird. Camptothecin, ein Topoisomerase-I-Inhibitor, kann ebenfalls kotranskriptionell Exon Skipping der MDM2-mRNA induzieren. Der durch Camptothecin ausgelöste Stress führt u.a. zur Hyperphosphorylierung der Pol II [Dutertre et al. 2010]. Hyperphosphorylierung der Pol II an den Serinresten 2 bzw. 5 kann zur verminderten Effizienz der Pol II-vermittelten

Elongation und damit zur Reduktion von Pol II-Molekülen führen [Öhrmalm und Akusjärvi, 2006]. Darüber hinaus beeinflusst Camptothecin die Interaktion zwischen EWS und YB-1 [Dutertre et al. 2010]. EWS ist ein Pol II assoziierter Faktor, der als Koregulator der Transkription mit verschiedenen Spleißfaktoren, wie YB-1, interagiert. Hingegen ist YB-1 ein Spleißosom assoziierter Faktor. In ungestressten Zellen ist die Interaktion zwischen EWS und YB-1 intakt, was die Expression der FL-MDM2-mRNA zur Folge hat. Nach Camptothecin Behandlung wird die Interaktion dieser Proteine inhibiert, wodurch es zum Exon Skipping kommt [Dutertre et al. 2010]. Dieses Beispiel zeigt, dass über Faktoren, wie EWS, eine Verknüpfungsstelle zwischen Transkription und Spleißen existiert, und dass die veränderte Expression solcher Faktoren das alternative Spleißen beeinflussen kann.

Mit dieser Arbeit soll der Einfluss von DNA-Schäden auf das Spleißen der MDMX-mRNA untersucht werden, da MDMX ein zentrales Protein bei der Zellantwort auf DNA-Schäden ist.

1.6 Zielsetzung

Das Spleißen stellt einen der wichtigsten Prozesse in der Zelle dar. Ein Ziel dieser Arbeit war daher, den Einfluss verschiedener Zytostatika auf das Spleißen der MDMX-mRNA in der Modellzelllinie OAW-42 zu untersuchen. Das verwendete Zytostatikum Cisplatin löst in der DNA Doppelstrangbrüche aus, wohingegen Camptothecin Einzelstrangbrüche verursacht. Es sollte untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen dem ausgelösten DNA-Schaden und dem Spleißen einzelner Exone gibt. Transkriptvarianten, die nach Behandlung der Zellen mit den Zytostatika erhalten werden, sollen einzeln in Plasmidvektoren ligiert und anschließend sequenziert werden.

Des Weiteren sollte das alternative Spleißen von Exon 6, welches zur Entstehung der MDMX-S-mRNA führt, untersucht werden. Das Verhältnis der MDMX-S-mRNA zur FL-MDMX-mRNA ist ein negativer prognostischer Marker in verschiedenen Tumoren. Es sollten daher Spleißfaktoren identifiziert werden, die am alternativen Spleißprozess von Exon 6 beteiligt sind. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob die MDMX-S-mRNA in ein Protein translatiert wird. Die Untersuchung, ob die MDMX-S-mRNA ein Substrat des NMD ist, stand hierfür im Mittelpunkt.

Die Bedeutung der Kinasen ATM und ATR auf das Spleißen einzelner mRNAs konnte durch verschiedene Gruppen bereits gezeigt werden. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss diese Kinasen sowie der Tumorsuppressor p53 auf das Spleißen der MDMX-mRNA nehmen.

2. Material

2.1 Zelllinien

Für die Anfertigung dieser Arbeit wurden die Ovarialkarzinomzelllinien OAW-42 und SKOV-3 verwendet (Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz
OAW-42	Cystadenokarzinom	[Wilson et al. 1984]
SKOV-3	Adenokarzinom	[Fogh et al. 1977]

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Camptothecin	Sigma, Steinheim
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cisplatin	Sigma, Steinheim
Desoxyribonukleotid-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 2,5mM)	Bioline, Luckenwalde
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DNA-Standard (100bp-Leiter)	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	PAA, Pasching

Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (96%)	Merck, Darmstadt
Ethanol (70%)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FKS)	Sigma, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Sigma, Steinheim
β -Mercaptoethanol (14,3 M)	VWR, Darmstadt
MES-Puffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol (100 % p.a.)	VWR Darmstadt
Mycoplasma OFF®	Minerva Biolabs, Berlin
Natrium-Acetat	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Serva, Heidelberg
NuPage 4-12% Bis-Tris-Gele	Invitrogen, Karlsruhe

Oligo(dt) Primer	Ambion, Darmstadt
Phosphatase-Inhibitor	Thermo Scientific, Bonn
ProteinAssay	BioRad, München
Proteinstandard 200 mg BSA/ml	Sigma, Steinheim
Protenase-Inhibitor Cocktail	Sigma, Steinheim
RNase OUT	Fermentas, St. Leon-Rot
Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
See Blue® Plus 2 Prestained Standard (1x)	Invitrogen, Karlsruhe
Transferpuffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Serva, Heidelberg
Tween 20	Serva, Heidelberg
WST-1 Reagenz	Roche, Penzberg

2.3 Kits

AMV Reverse Transkriptase (20 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare, Freiberg
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystem, USA
QIAshredder-Säulen	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extractions Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden

Plasmid Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RNAeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
5x HOT FIREPol® Eva Green qPCR Mix Plus	Solis Biodyne, Estland

2.4 Enzyme

AMV Reverse Transcriptase	Promega, Mannheim
Hot FIREPol® (5 U/μl)	Solis Biodyne, Estland

2.5 Oligonukleotide

Tabelle 2-2: Primer für die PCR

Primer	Sequenz 5' → 3'	Orientierung	Referenz
<i>GAPDH_Ex2_S</i>	GCCACATCGCTCAGACACCA	sense	diese Arbeit
<i>GAPDH_Ex9_AS</i>	GACTGAGTGTGGCAGGGACT	antisense	diese Arbeit
<i>MDMX-11</i>	ACCAACAGACTGCAGTTT	sense	AG PD Bartel
<i>MDMX-12</i>	TGCCTAAGAACATTCTCTGACA	antisense	AG PD Bartel
<i>MDMX-139</i>	GACTGCAGTTTCTTCACTACC	sense	AG PD Bartel
<i>MDMX-14</i>	ATGTTTCGTACTACCATTATGCTATAAAA	antisense	AG PD Bartel
<i>Ex3_4 fw</i>	CTGTAAAGAGGTCATGCACT	sense	diese Arbeit
<i>Ex8_9 rev</i>	AATGGCAGTACCCACATCCTGAT	antisense	diese Arbeit
<i>MDMX 487 rev</i>	AAGTGACAAGATTCTTTCTTAGC	antisense	diese Arbeit
<i>T7_Xi5_21608_fw</i>	TAATACGACTCACTATAGG- GATATGGCCTGTCTTGGTCTTT	sense	diese Arbeit
<i>Xi6_22159_rev</i>	ATATCCTCAAACACACACACACAGG	antisense	diese Arbeit

Tabelle 2-3: Primer für die qRT-PCR

Primer	Sequenz 5' → 3'	Orientierung	Referenz
<i>BACT 1009 fw</i>	TAGGGAGTATATAGGTTGGGGAAGTT	sense	diese Arbeit
<i>BACT 1154 rev</i>	AACACACAATAACAAACACAAATTCAC	antisense	diese Arbeit
<i>Xquant410fw</i>	CTGGGACGTCAGAGCTTCTCCG	sense	diese Arbeit
<i>FL-X rev</i>	CTGTGCGAGAGCGAGAGTCTG	antisense	diese Arbeit
<i>XS-AS</i>	GCACTTTGCTGTAGTAGCAGTG	antisense	AG PD Bartel
<i>X1514 fw</i>	ATGGAAGGACGGGCCATCTT	sense	diese Arbeit
<i>MDMX-14</i>	ATGTTTCGTACTACCATTATGCTATAAA	antisense	AG PD Bartel
<i>SC35_824_S(1,6)</i>	CGGTGTCCTCTTAAGAAAATGATGTA	sense	Gehring et al. 2005
<i>SC35_1210_S(1,7)</i>	GGCGTGTATTGGAGCAGATGTA	sense	Gehring et al. 2005
<i>SC35_1933_AS</i>	CTGCTACACAACCTGCGCCTTTT	antisense	Gehring et al. 2005
<i>ATM711fw</i>	ACAGAAGAGCACCTAGGCTA	sense	diese Arbeit
<i>ATM905rev</i>	GCCTGAAGTACACAGAGAAC	antisense	diese Arbeit
<i>ATR3696fw</i>	TGTTGCAGAGCTTGGGACTG	sense	diese Arbeit
<i>ATR3861rev</i>	CTTGACAGCATCCCTGTTT	antisense	diese Arbeit

Tabelle 2-4: siRNAs

Gen	Target-Sequenz 5' → 3'	Referenz
<i>Upf1</i>	AAGATGCAGTCCGCTCCATT	Gehring et al. 2005
<i>PUF60</i>	AAGCAGATGAACTCGGTGATG	Hastings et al. 2007
<i>hnRNP-C</i>	AAGCAGGTGTGAAACGATCTG	König et al. 2010
<i>P53</i>	AAGGAAATTTGCGTGTGGAGT	Hs_TP53_9 (Qiagen)
<i>ATM</i>	TTGGCTTATACGCGCAGTGTA	Hs_ATM_9 (Qiagen)
<i>ATR</i>	CAGGCACTAATTGTTCTTCAA	Hs_ATR_12 (Qiagen)
<i>Luciferase</i>		AllStars Neg. Control (Qiagen)

2.6 Antikörper

Tabelle 2-5: sekundäre Antikörper

	Verdünnung	Isotyp	Firma
<i>anti-rabbit</i>	1:10000	Polyclonal goat, Immunglobulins/HRP	Dako Denmark A/S
<i>anti-mouse</i>	1:10000	Polyclonal rabbit, Immunglobulins/HRP	Dako Denmark A/S

Tabelle 2-6: primäre Antikörper

	Verdünnung	Isotyp	Firma
<i>Vinculin</i>	1:1000	mouse	Sigma, Steinheim
<i>P53</i>	1:1000	Monoclonal mouse	Dako Denmark A/S
<i>P53-Ser 15</i>	1:1000	rabbit	Cell Signaling
<i>P21</i>	1:500	rabbit	Santa Cruz Biotech.
<i>ATM</i>	1:500	rabbit	Cell Signaling
<i>ATR</i>	1:1000	rabbit	Bethyl Laboratories, Inc.
<i>PUF60</i>	1:2000	Rabbit	Sigma-Aldrich
<i>hnRNP-E1</i>	1:1000	Rabbit	Sigma-Aldrich
<i>hnRNP-C1/2</i>	1:2000	mouse	Sigma-Aldrich
<i>Chk1-Ser345</i>	1:500	Rabbit	Cell signaling
<i>MDMX</i>	1:1000	Rabbit	Bethyl Laboratories, Inc

2.7 Verbrauchsmittel und Geräte

Agarose-Gelkammer	Biotec-Fischer
Analysenwaage	Sartorius, Germany
Biocenter 2001 (Brutschrank)	Biometra, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Einweg-Plastikartikel für Zellkultur	Greiner, Frickenhausen

Elektrophorese-Gerät	BioPlex, Freiburg
Fusion Fx7	Vilber-Lourmat, Eberhardzell
Magnetrührer	IKA-Labortechnik, Staufen
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Milli-Q tetradest. Wasseranlage	Millipore,
Peltier Thermal Cyclers	Bio Rad, München
Pipetten	Nunc, Wiesbaden Biebrich
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Plattenreader (infinite M200)	Tecan,
Rotor-Gene RG-3000	Corbett, Wasserburg
Trio-Thermoblock TB1	Biometra, Göttingen
Z2 (Zellzahlzählgerät)	Coulter-Beckman, Krefeld
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg

3. Methoden

3.1 Zellkulturen

Die verwendeten Ovarialkarzinomzelllinien wurden mit DMEM-Medium bei 5 % CO₂ und maximaler Luftfeuchte bei 37 °C als adhärente Monolayer-Kulturen herangezogen. Die Passagierung konfluenten Zellen erfolgte im Verhältnis 1:5. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation der Zellen mit 0,5 ml Trypsin-Lösung für 2 min bei 37 °C. Die abgelösten Zellen wurden in 3 ml Zellkulturmedium überführt und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet ist in 15 ml Zellkulturmedium aufgenommen und je 3 ml in eine neue Zellkulturflasche überführt worden. Zum Einstreuen der Zellen wurde das Pellet in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zelldichte ist am Coulter Zellzahlzählgerät ermittelt worden.

Zur Kryokonservierung wurde das nach dem Zentrifugieren erhaltene Zellpellet in 1,8 ml Gefriermedium (DMEM mit 20 % DMSO) aufgenommen und in ein 2 ml Gefrierrohrchen überführt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C und -80°C für je 24 h und abschließend bei -180°C.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Gefrierrohrchen kurz in 37 °C warmes Wasser gegeben, dann der Inhalt zügig in 4 ml des Zellkulturmediums überführt und die Zellen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in 4 ml Zellkulturmedium aufgenommen und zentrifugiert, um das für Zellen toxische DMSO heraus zu verdünnen. Anschließend wurde das Zellpellet in 3 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt.

3.1.1 Zytotoxizitätsassay

Zur Ermittlung der LD₅₀-Werte der Zytostatika Cisplatin und Camptothecin, sowie des ATM/ATR-Inhibitors CGK733 wurde der WST-1 Test verwendet.

Für den WST-1 Test wurden 4000 Zellen in einem Endvolumen von 100 µl in einer 96-Well-Platte ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Behandlung. Vor der Behandlung wurde das Medium gewechselt. Die Zytostatika wurden in einer Konzentrationsreihe von 0-50 µM und der Inhibitor von 0-20 µM auf die Zellen gegeben. Zum Vergleich der Inhibitorwirkung wurde dessen Lösungsmittel Chlorophorm/Methanol (5:1) im gleichen Volumen auf die Zellen gegeben. Nach 24 h und 48 h erfolgte die Zugabe von 10 µl WST-1-Reagenz. Die

Zellvitalität wurde nach 2 h bei 434 nm und einer Referenzwellenlänge (620 nm) mit Hilfe des Plattenreaders (Tecan infinitem200) gemessen.

3.1.2 Behandlung der Zellen mit Zytostatika

Für die Behandlung der Zellen mit den Zytostatika Cisplatin (20 µM) und Camptothecin (8 µM) wurden die Zellen 24 h vor Behandlungsstart in 6-Well-Platten (2 ml DMEM-Medium) für die RNA- und 6cm-Schalen (3 ml DMEM-Medium) für die Proteinisolation, eingestreut. Direkt vor der Behandlung ist das Medium gewechselt worden. Bei den Zellen, die mit Cisplatin behandelt wurden ist nach 2, 6, 10, 18, und 24 Stunden RNA und Protein isoliert worden. Nach Camptothecingabe erfolgte die Isolation nach 3, 6, 10, 18 und 24 Stunden.

Bei der Kombinationsbehandlung des ATM/ATR-Inhibitor CGK733 und Cisplatin ist der Inhibitor für 24 h vorinkubiert worden. Es erfolgte ein Mediumwechsel vor der Behandlung mit Cisplatin (18 h).

3.2 Präparationen von Nukleinsäuren

3.2.1 Isolation von DNA aus Zellkulturen

Die Zellen wurden in 6cm-Schalen ($1 \cdot 10^6$) 24 h in 3 ml DMEM-Medium kultiviert. Es erfolgte die Trypsinierung der Zellen mit anschließender Zentrifugation. Nach Absaugung des Überstandes wurde das Zellpellet mit 200 µl homogenisiert. Die weitere Isolation der Zellen erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 100 µl eluiert.

3.2.2 Isolation von Plasmid-DNA

Nach erfolgreicher Vermehrung der Einzelkolonien über Nacht wurden diese bei 4000 rpm für 8 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Plasmidisolation erfolgte mit Hilfe des Plasmid Miniprep Kits von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 50 µl Elutionspuffer (EB).

3.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch mit dem BioPhotometer (Eppendorf). Die Proben wurden dazu 1:49 verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt.

3.2.4 Isolation von RNA aus Zellkulturen

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellkulturen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Das Zellpellet wurde in 350 µl RLT-Puffer, der 1:100 β-Mercaptoethanol (14,3 M) enthielt, lysiert. Die Homogenisierung der Zellen erfolgte durch QIAshredder-Säulen. Das Homogenisat wurde zusammen mit dem gleichen Volumen 70 %igem Ethanol auf die Säule des RNeasy Mini Kits gegeben und 1 min. zentrifugiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Elution der RNA mit 30 µl Elutionspuffer.

3.2.5 RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die Proben 1:49 verdünnt und anschließend photometrisch mit dem BioPhotometer (Eppendorf) gemessen. Die Reinheit wurde mittels des Quotienten aus $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ angegeben, wobei ein Wert zwischen 1,8 und 2 eine hohe Reinheit bedeutete.

3.3 Reverse Transkriptions-Reaktion

Zur Untersuchung der Expression einzelner Gene der verschiedenen Zelllinien wurde zunächst die Gesamt-RNA mittels AMV Reverse Transkriptase von Promega im 20 µl Ansatz in cDNA umgeschrieben. Hierfür ist generell 1 µg RNA eingesetzt worden.

Im ersten Schritt ist die entsprechende Menge RNA zusammen mit Oligo(dT)-Primern (0,5 µg/µg RNA) und Aqua tetradest. gemischt und für 5 min. bei 65°C im BioRad Cycler denaturiert worden. Anschließend erfolgte die Zugabe des Master-Mixes (Tabelle 3-1) auf Eis. Es folgten die Primeranlagerung bei 42°C (10 min.), dann die cDNA-Synthese bei 55°C (60 min.) und abschließend der Denaturierungsschritt bei 85°C (5 min.).

Die entstandenen cDNAs dienen in den folgenden PCRs als Matrize.

Tabelle 3-1: 1x Master-Mix

1x Mastermix	7,5 µl
AMV-Puffer	4 µl
10 mM dNTP-Mix	2 µl
Ribolock RNase Out (40U/µl)	0,5 µl
AMV-RT (10U/µl)	1 µl

3.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

3.4.1 Nachweis der MDMX-Transkripte

Zum Nachweis der MDMX-Transkripte wurde jeweils 1 µl, der unter 3.3.1 erhaltenen cDNA, als Template eingesetzt. Der 25 µl Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 3-2: 1x PCR-Ansatz

1x PCR-Ansatz	24 µl
10x Reaktionspuffer (BD)	2,5 µl
2,5 mM dNTP	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	2,5 µl
20 pmol/µl Primer	1,0 µl
HotFirePol	0,5 µl
<i>Aqua tetradest.</i>	14 µl

Zum 24 µl Ansatz wurde 1 µl Template hinzugefügt und die Transkripte im Cycler von BioRad nach folgendem Programm amplifiziert:

Schritt 1:	95°C	15 min	} 29x
Schritt 2:	95°C	30 s	
Schritt 3:	58°C	30 s	
Schritt 4:	72°C	2 min	
Schritt 5:	72°C	10 min	

Zur Amplifikation des FL-MDMX-Transkripts und dessen Spleißvarianten wurde eine „nested“ PCR durchgeführt. Für die „nested“ PCR ist als Template 1 µl aus der ersten PCR eingesetzt worden.

Für weitere spezifische PCRs wurde die optimale Annealing Temperatur mittels Temperatur-Gradienten ermittelt.

3.4.2 Nachweis der Deletion von Exon 4 und Exon 6

Der PCR-Ansatz zum Nachweis der Deletion von Exon 4 und Exon 6 setzte sich, wie unter 3.4.1 beschrieben zusammen. Zur Identifizierung des Ein - bzw. Ausschlusses von Exon 4 sind die Primer MDMX-139 und X487rev und von Exon 6 die Primer XEx3_4fw und XEx8_9rev verwendet worden.

Für die Amplifikation dieser mRNA-Transkripte wurden die Bedingungen modifiziert:

Schritt 1:	95°C	15 min	} 35x
Schritt 2:	95°C	20 s	
Schritt 3:	58°C	20 s	
Schritt 4:	72°C	30 s	
Schritt 5:	72°C	10 min	

3.4.2 Nachweis des housekeepinggens GAPDH

Für die Amplifikation von GAPDH wurde der gesamte Leserahmen amplifiziert. Der PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 3-3:

1x PCR-Ansatz	24 µl
10x Reaktionspuffer (BD)	2,5 µl
2,5 mM dNTP	2,0 µl
25 mM MgCl ₂	2,5 µl
20 pmol/µl Primer	0,5 µl
HotFirePol	0,5 µl
<i>Aqua tetradest.</i>	15,5 µl

Die Bedingungen zur Amplifikationen entsprachen denen der MDMX-PCR, wie unter 3.4.1 beschrieben, mit Ausnahme der Annealing Temperatur. Diese wurde von 58°C auf 61°C erhöht, um eine spezifische Amplifikation zu erreichen.

3.5 Quantitative Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR unterscheidet sich von der herkömmlichen PCR darin, dass die gebildete PCR-Produktmenge während der gesamten Reaktion in Echtzeit verfolgt werden kann. Hierfür wurde der EvaGreen PCR Kit von Solis Biodyne verwendet (siehe 2.3).

Tabelle 3-4: Eva-Green Mastermix

1x Mastermix	20 μ l
EvaGreen Mix ohne $MgCl_2$	4 μ l
25 mM $MgCl_2$	1 μ l
20 pmol/ μ l Primer	0,25 μ l
Aqua dest.	13,5 μ l
cDNA	1 μ l

Eva-Green ist ein Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet und dadurch sein Fluoreszenzspektrum verändert. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte nach jedem Elongationsschritt (72°C).

Die Spezifität der verwendeten Primer (siehe 2.5) wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse untersucht. Dies stellt sicher, dass sich nur ein PCR-Produkt gebildet hat. Die Auswertung erfolgte über eine Softwareinterne komparative Methode. Für diese Methoden wurde das Referenzgen β -Aktin (BACT) verwendet, welches als 100 %-Wert im Vergleich zu jeder einzelnen Probe angesehen wurde. Diese Methode gibt ein Mengenverhältnis zwischen den einzelnen Proben wieder. Als weitere Methode wurde die quantitative Auswertung verwendet. Hier diente eine definierte Verdünnung von Plasmidstandards als Mengenmaß (Moleküle/ μ l).

Für die Amplifikation von β -Aktin und der Deletion von Exon 6 (FL-MDMX und MDMX-S) wurden folgende Bedingungen verwendet:

Schritt 1:	95°C	15min	} 39x
Schritt 2:	95°C	10s	
Schritt 3:	62°C	15s	
Schritt 4:	72°C	20s	

Der Ansatz zur Amplifikation des Exon 11 der MDMX-mRNA (FL-MDMX), sowie der p53-, ATM- und ATR-mRNA unterschied sich allein im EvaGreen-Mix. Der für diese Anwendungen

verwendete Mix enthielt bereits $MgCl_2$, weshalb dieses nicht mehr zugegeben werden musste. Auch die Bedingungen zur Amplifikation wurden leicht modifiziert. Hier ist die Annealing-Temperatur von $62^\circ C$ auf $60^\circ C$ gesenkt worden.

3.6 Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierung wurde der BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystem, USA, verwendet. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 3-5: Sequenzierreaktion

1x Sequenzierreaktion	20 μl
Sequenziermix	2 μl
Sequenzierpuffer	12 μl
Primer (0,8 pmol/ μl)	4 μl
DNA	2 μl

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden 3 μl Sequenziermix benötigt. Die Sequenzierreaktion erfolgte im Biometra-Cycler.

Schritt 1:	96°C	1 min	} 26x
Schritt 2:	96°C	10 s	
Schritt 3:	50°C	5 s	
Schritt 4:	60°C	4 min	
Schritt 5:	4°C	∞	

Für die Fällung der Sequenzierprodukte mussten die Reaktionsgefäße vor Lichteinfall geschützt werden. Pro 20 μl Ansatz wurden 2 μl 125 mM EDTA, 2 μl 3 M Na-acetat und 50 μl 96 %iges Ethanol zugegeben, gevortext und im Dunkeln für 15 min. bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 20 min. bei 6000 rpm und $4^\circ C$. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet ist mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nochmals für 10 min. zentrifugiert worden. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet ist bei $80^\circ C$ für 10 min. im Heizblock getrocknet worden.

Die automatische Auftrennung der Proben erfolgte am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durch Frau Dr. Darmer unter Nutzung eines ABI 3100 Genetic Analyser C der Firma Applied Biosystem.

3.7 DNA-Untersuchungen

3.7.1 Agarose-Gelelektrophorese

Der Nachweis der erfolgreichen Amplifikation des PCR-Produktes wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Die Elektrophorese erfolgte in der Gelkammer von Biotec-Fischer mit 0,5x TBE-Laufpuffer. Es wurden in Abhängigkeit der Fragmentgröße des PCR-Produktes 0,8-2 %ige Agarosegele (jeweils in 100 ml 0,5x TBE-Laufpuffer und 2,5 µl Ethidiumbromid [10 mg/ml]) angefertigt. 10 µl des PCR-Produkts sind zusammen mit 1,5 µl Auftragspuffer auf das Gel aufgetragen worden. Die Auftrennung erfolgte bei ca. 120 V für 1 h. Zum Nachweis der Banden wurden diese mit UV-Licht sichtbar gemacht und mittels Geldokumentationssystem Fusion FX7 (Vilber Lourmat) ausgewertet. Ein 100 bp DNA-Längensstandard diente der Größenbestimmung der PCR-Produkte.

Auftragspuffer:	Formamid	10 ml
	Bromphenolblau	10 mg
	EDTA (0,5 M, pH 8)	200 µl
5x TBE-Puffer	Tris-HCl	54,0 g
	Borsäure	27,5 g
	EDTA (0,5 M, pH 8)	20 ml
	Aqua bidest. auf 1 l auffüllen	

3.7.2 DNA-Aufreinigung aus Agarose-Gelen

Die gewünschten Banden wurden unter UV-Licht mit Hilfe eines sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert. Die Isolation erfolgte mit dem QIAquick Gel Extractions Kit (Qiagen). Zum Gelstück wurden 3 Volumen des Puffers QG (Qiagen) gegeben. Die weitere Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 50 µl Elutionspuffer (EB) eluiert.

3.8 Klonierung von DNA-Fragmenten

3.8.1 Ligation

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren wurde der TOPO-TA Cloning Kit der Firma Invitrogen verwendet. Die Ligationsreaktion (Tabelle 3-6) erfolgte für 5 min. bei RT.

Tabelle 3-6: Ligationsreaktion

1x Ligationsreaktion	6 μ l
Salzlösung	1 μ l
pCR 2.1 Vektor	1 μ l
frisches PCR-Produkt	4 μ l

3.8.2 Transformation

Für die Transformation wurden 2 μ l des Ligationsansatzes zu 50 μ l chemisch kompetenter E.coli-Zellen (TOP10, Invitrogen) gegeben und für 20 min. bei 4°C inkubiert. Zur DNA-Aufnahme erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42°C. Pro Ansatz wurden 250 μ l S.O.C. Medium (Kitkomponente) hinzugegeben und horizontal für eine Stunde bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Auf vorbereitete, ampicillinhaltige Platten (50 μ g/ml) wurden 40 μ l X-Gal (40 mg/ml) gegeben, bevor 50 μ l des Transformationsansatzes ausgestrichen wurden. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37°C.

Die durch X-Gal ermöglichte Blau-Weiß-Selektion erleichterte das Picken von nur weißen Klonen. Je ein weißer Klon wurde unter zu Hilfenahme eines autoklavierten Zahnstochers in 10 ml LB-Medium (RT) mit 100 μ g/ml Ampicillin in ein 50 ml-Greiner-Röhrchen gegeben und über Nacht bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte wie unter 3.2.2 beschrieben.

3.9 Western-Blot

3.9.1 Isolation von Gesamtproteinlysat

Zur Isolation von Gesamtproteinlysat aus Zellkulturen wurden die in 6 cm-Schalen angezogenen Zellen auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und die Zellen 2-Mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend erfolgten die Zugabe von 60 μ l Giordano-Lysepuffer

und die Inkubation von 15 min. auf Eis. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen abgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 15 min. bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte die Entfernung der Zelltrümmer durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C. Der Überstand (Protein) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

3.9.2 Protein-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford angewandt. Dazu wurde ein Mix aus Bradford-Lösung und Aqua bidest. im Verhältnis 1:5 hergestellt und 199 µl des Gemisches mit 1 µl Proteinprobe auf eine Mikrotiterplatte gegeben. Die Messung der Absorption erfolgte nach 10 minütiger Inkubation bei 595 nm mit Hilfe des Plattenreaders (Tecan infinitem200). Zur Ermittlung der Konzentration wurde eine BSA-Standardreihe mitgeführt.

3.9.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden 4-12 %ige Bis-Tris-Gele (Invitrogen) verwendet. Die Proteinproben (15 µg Proteinlysate) wurden mit je 7 µl LDS-sample Buffer und 3 µl Sample Reducing Agent versetzt und mit Aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 30 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben für 5 min. bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x MES-Puffer. Zur Größenbestimmung wurden 15 µl des Proteinmolekulargewichtsstandards SeeBlue®Plus 2 Prestained Standard von Invitrogen mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei 160 V und 4°C für ca. 1 h.

3.9.4 Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran

Die nach der Größe aufgetrennten Proteine wurden unter Verwendung einer Mini Trans-Blot Cell-Apparatur von Biorad auf eine PVDF-Membran (0,45 µm Porengröße, Millipore) übertragen. Hierfür wurde die Membran für 30 s in Methanol aktiviert und in 1x Transferpuffer vorinkubiert. Darüber hinaus wurden je 2 Schwämme und Filterpapiere in 1x Transferpuffer vollständig benetzt. Danach erfolgte der luftblasenfreie Zusammenbau der Tank-Blot-Kassette. Hierfür wurden ein Schwamm, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier und Schwamm übereinander platziert. Die fertig gepackte Kassette wurde zusammen mit einem Eisblock bei 300 mA für 3 h und 4°C geblottet.

3.9.5 Immundetektion

Die PVDF-Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen unter ständiger Bewegung für 1 h bei Raumtemperatur in 10 %iger Milchpulver-PBS-T-Lösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (Tabelle 2-6) ebenfalls in 10 %iger Milchpulver-PBS-T-Lösung unter ständiger Rotation im Kühlschrank über Nacht. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für 5 min. mit PBS-T gewaschen. Danach wurde 1 µl des Sekundärantikörpers in 10 ml 10 %iger Milchpulver-PBS-T-Lösung verdünnt und die Membran für 1 h mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde 3-Mal für 5 min. mit PBS-T und 2-Mal für 5 min. mit PBS gewaschen. Zum Nachweis der Antikörperbindung ist das ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent von GE Healthcare verwendet worden. Nach 5-minütiger Inkubationszeit wurde die Membran zwischen zwei Druckerfolien gelegt und die Chemolumineszenz am Dokumentations-system Fusion Fx7 detektiert.

3.10 RNA-Pull-Down

3.10.1 Amplifikation des Exon 6-Fragments

Für die Amplifikation des Exon 6-Fragmentes wurden Primer verwendet, die spezifisch im Intron 5 und Intron 6 binden. Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 3-7:

1x PCR-Ansatz	24 µl
10x Reaktionspuffer (BD)	2,5 µl
2,5 mM dNTP	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	2,5 µl
20 pmol/µl Primer	0,5 µl
HotFirePol	0,25 µl
Aqua tetradest.	15,25 µl
20ng DNA (OAW-42)	1 µl

Die Amplifikation des Exon6-Fragmentes fand unter folgenden Bedingungen statt:

Schritt 1:	95°C	15 min	} 35x
Schritt 2:	95°C	30 s	
Schritt 3:	62°C	30 s	
Schritt 4:	72°C	30 s	
Schritt 5:	72°C	10 min	

Das Produkt dieser PCR wurde in einem 1 %igen Agarosegel untersucht und ist anschließend aus dem Gel unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) gereinigt worden.

3.10.2 *In vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription wurde das Megascript T7 *in vitro* transcription kit von Ambion verwendet. Es erfolgte eine Konzentrationsbestimmung des gereinigten PCR-Produktes, da 150 ng des Exon6-Fragmentes (Ex6-V = Template) benötigt wurden. Die Komponenten der Transkriptionsreaktion sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle 3-8:

	Ex6-V. w/o	Ex6-V. + Biotin	Kontrolle+Biotin
nukleasefreies Wasser	2,4 µl	2,4 µl	3,71 µl
ATP (75mM)	2 µl	2 µl	2 µl
GTP (75mM)	2 µl	2 µl	2 µl
CTP (75mM)	2 µl	2 µl	2 µl
UTP (75mM)	2 µl	1,9 µl	1,9 µl
Bio-16-UTP (5mM)	0 µl	1,5 µl	1,5 µl
Template (150ng)	4,2 µl	4,2 µl	2,89 µl
10xPuffer	2 µl	2 µl	2 µl
Enzym Mix	2 µl	2 µl	2 µl
Gesamt	20µl	20µl	20µl

Die Reaktion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das Produkt ist in 50 µl nucleasefreiem Wasser aufgelöst worden. Zur Überprüfung einer erfolgreichen *in vitro* Transkription wurden 0,5 µg Produkt auf einem 1 %igen Agarosegel untersucht.

3.10.4 Präzipitation der RNA-Bindeproteine

Für die RNA-Protein-Bindung wurde Gesamtproteinlysate verwendet. Die Isolation erfolgte, wie unter 3.9.1 beschrieben. Das Proteinlysate inkubiert mit ~100 µl gepackten beads für 1 h bei 4°C über Kopf schüttelnd. Bei diesem Schritt wurden bereits solche Proteine aus dem Proteinlysate herausgezogen, die unspezifisch an den beads binden.

1. Protein-beads-Mix 1 min. bei 5000 rpm zentrifugieren (4°C)
2. Überstand (Proteinlysate) abpipettieren
3. Add. Protease-Inhibitor (Roche) und RNase-Inhibitor (100 U/ml)
4. 1 min. bei 5000 rpm und 4°C zentrifugieren (fertiges Proteinlysate)

Nach 4h Inkubation der RNA mit den gepackten beads wurde folgendermaßen weiter gearbeitet:

1. RNA-beads-Mix mit 1 ml HS-WB-400 waschen
2. 5 min. bei 4°C über Kopf schütteln
3. 1 min. bei 5000 rpm zentrifugieren (4°C)
4. Überstand verwerfen, Waschschrift noch 2-mal wiederholen
5. fertiges Proteinlysate (2,7 mg je Probe) zum gereinigten RNA-Bead-Mix geben
6. Gesamtansatz (RNA-Protein-beads-Mix) über Nacht bei 4°C über Kopf schütteln
7. Gesamtansatz stringent mit 1 ml HS-WB-400 waschen
8. 1 min. bei 5000 rpm zentrifugieren (4°C)
9. Überstand verwerfen, Waschschrift noch 4-mal wiederholen
 - a. Vor dem letzten Waschschrift gesamten Ansatz in neues Reaktionsgefäß überführen
 - b. Überstand komplett entfernen, ggf. nochmal zentrifugieren
10. Elution der Proteine, inkl. gebundener RNA, mit 50 µl Urea, 0,01 % NP40, 1 mM DTT unter schütteln (900 rpm) 30 min. bei RT
11. 1 min. bei 5000 rpm zentrifugieren (RT)
12. Überstand in gekühltes Eppi überführen, Pellet (beads) in Ladepuffer+SDS-Sample Puffer (Gesamtvolumen 30 µl) aufnehmen = beads-Kontrolle
13. Proteine mit 5-fachem Volumen (250 µl) eiskalten Aceton (-20 °C) für 1 h bei -20°C präzipitieren
14. 30 min. bei RT und 13000 rpm zentrifugieren

15. Pellet mit 1 ml 80 %igem Ethanol waschen
16. 10 min. bei RT und 13000 rpm zentrifugieren
17. Waschschritt wiederholen
18. Pellet leicht trocknen lassen
19. Pellet in 30 µl 2x Sample Puffer (Ladepuffer + SDS-Sample Puffer) resuspendieren
20. 5 min. bei 95°C um Pellet aufzulösen
21. Wenn homogen, dann erneut 5 min. bei 95°C
22. Ansatz kurz mischen, danach herunter zentrifugieren
23. 10 µl je Probe für das SDS-Gel (5 % Sammelgel, 10 % Trenngel)
24. Gellauf (1 h bei 150 V und 5 h bei 200 V) bei 4°C

Puffer:

HS-400 (15 ml):	300 µl 1 M HEPES pH 7,9 (4°C) 1500 µl 4 M KCl 150 µl 1 M MgCl ₂ 15 µl 10 % NP40 15 µl 1 M DTT 13020 µl H ₂ O
HS-400 (20 ml):	400µl 1M HEPES pH 7,9 (4°C) 2000µl 4M KCl 200µl 1M MgCl ₂ 20µl 10% NP40 20µl 1M DTT 17360µl H ₂ O
Urea Elution:	6 M Urea + 1 mM DTT + 0,01 % NP40

3.10.5 Silberfärbung

1. Fixierung ÜN bei RT

Fixierungslösung (250 ml):	25 ml Essigsäure (glacial) 75 ml 99 % Ethanol 150 ml bidest. H ₂ O
----------------------------	---

2. Sensibilisierung unter leichtem Schütteln für 45 min. bei RT

Sensibilisierungslösung (250 ml):	0,75 g Potassiumtetrathionat (K ₂ S ₄ O ₆) 12,27 g Potassiumacetat 75 ml 99 % Ethanol add. 250 ml H ₂ O
-----------------------------------	---

6-Mal 10 min. mit bidest. H₂O waschen

3. Silberfärbung für 1 h unter schütteln bei RT

Silbernitratlösung (200 ml): 0,4 g Silbernitrat
200 ml bidest. H₂O

Gel danach zügig in bidest. H₂O waschen

4. Entwicklung für ca. 5 min. unter ständigem Schütteln (per Hand)

Entwicklerlösung (250 ml): 7,5 g K₂CO₃
75 µl 37 % Formaldehyd
15,62 µl 20 % Na-thiosulfat
add. 250 ml bidest. H₂O

5. Abstopfung unter schütteln für 45 min. bei RT

Stopplösung: 10 g Trizma bas
5 ml Essigsäure
add. 250 ml H₂O

2-mal 30 min. mit bidest. H₂O unter Schütteln bei RT waschen

3.11 Transfektionsversuche

3.11.1 Transfektion von siRNA

Zur Transfektion mit siRNAs wurde mit Interferin von PeqLab gearbeitet. Ein Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 3-9:

1x Ansatz	6-well-Platte (2 ml Medium)	6cm-Schale (3 ml Medium)
10 nM siRNA	1,1 µl	1,65 µl
Optimem	198,9 µl	198,35 µl
Interferin	8 µl	12 µl

siRNAs gegen PUF60, hnRNP-C1/2 und Upf1 wurden in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt. Für die Transfektion gegen p53 wurde mit 10 nM und gegen ATM und ATR mit jeweils 20 nM gearbeitet. Als Kontrolle ist siRNA gegen das Luciferasegen in angepasster Konzentration transfiziert worden. 24 h nach der Transfektion fand ein Mediumwechsel

statt. Die Zellen inkubierten weitere 48 h bis zur Isolation. Eine Ausnahme stellte die Transfektion der siRNA gegen p53 dar. 4 h nach der Transfektion wurde das Medium bereits erneuert und die Behandlung mit Cisplatin (18 h) fand zusätzlich statt. Die Isolation erfolgte 24 h nach Transfektion.

3.11.2 Transfektion des pC3.1-p53 Expressionsvektors

Zur Transfektion des pC3.1 Leervektor und des pC3.1-p53 Vektor mit HA-Tag wurde mit Lipofectamin2000 von Life Technologie gearbeitet. Beide Vektoren sind durch Stefanie Hammer (persönliche Mitteilung) zur Verfügung gestellt worden. Es wurden 2 µg Vektor-DNA pro Ansatz verwendet. Es sind für einen Ansatz in einer 6 cm-Schale 10 µl Lipofektamin2000 und 490 µl Optimem 5 min. inkubiert worden. Des Weiteren wurde die Vektor-DNA (2 µg) in Optimem auf ein Gesamtvolumen von 500 µl verdünnt. Beide Mixe wurden zusammengeführt, gemischt und inkubierten 20 min. bei RT.

3.12 Nutzung von Internet Webseiten (ESE-Finder, splice-site-prediction website)

Online: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html (Stand 25.01.2013)

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur MDMX-Expression nach DNA-Schaden

Zur Untersuchung der Expression von MDMX nach einem DNA-Schaden wurde die Ovarialkarzinomzelllinie OAW-42 verwendet. Diese Zelllinie diente für nahezu alle Versuche als Modellzelllinie.

Der kodierende Bereich der „full-length“-MDMX-mRNA (FL-MDMX) wurde mittels genspezifischer Primer in einer PCR untersucht (Abb. 4-1). Um mögliche Änderungen des Spleißens zu detektieren, ist eine „nested“-PCR durchgeführt worden. Das Bandenmuster, das sich aus der Primerkombination für MDMX (MDMX-11/MDMX-12 und MDMX-139/MDMX-14) ergab, ist in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt. Die Auftrennung erfolgte in einem 0,8 %igen Agarosegel. Zur Untersuchung des Spleißens von Exon 6 der MDMX-mRNA diente die Primerkombination XEx3_4_fw und XEx8_9_rev. Das Spleißen von Exon 4 ist mit den Primern MDMX-139 und X487 rev untersucht worden. Die Produkte beider PCR Reaktionen wurden in einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrollgen diente das Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenasegen (GAPDH). Es wurde der gesamte Leserahmen mittels der Primer GAPDH_Ex1_S und GAPDH_Ex9_AS amplifiziert. Die Auftrennung erfolgte in einem 1 %igen Agarosegel.

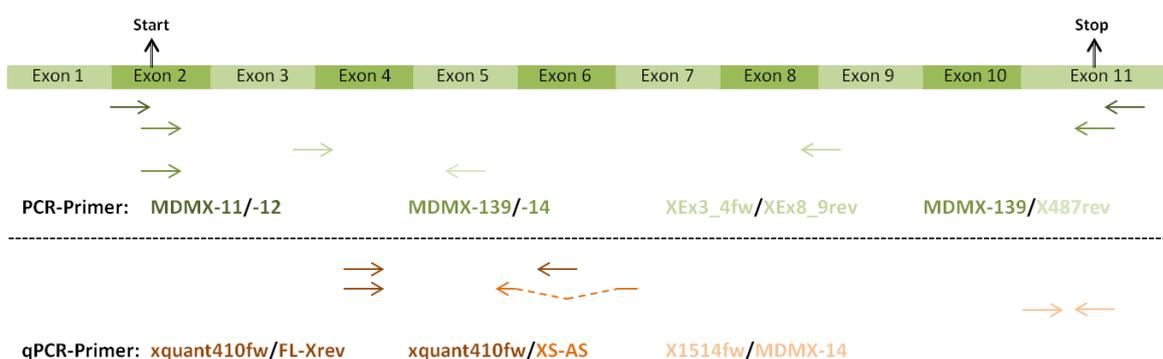


Abb. 4-1: Schematische Darstellung der Bindungsstellen der verwendeten PCR- und qPCR-Primer in der MDMX-mRNA Sequenz

Mittels Real-Time PCR wurde quantitativ das Herausspleißen von Exon 6 der MDMX-mRNA untersucht. Hierfür wurde die Primerkombination xquant410fw und XS-AS verwendet. Der XS-AS Primer bindet exonübergreifend die Exone 5 und 7, wodurch das Fehlen von Exon 6 (-Ex6) spezifisch dargestellt werden kann. Der Primer FL-Xrev bindet im Exon 6 und stellt in

Kombination mit dem forward Primer xquant410fw solche Transkripte dar, denen das Exon 6 (+Ex6) nicht herausgespleißt wird. Die Gesamttranskriptmenge der MDMX-mRNA wurde mit den Primern X1514fw und MDMX-14 bestimmt. Zur Normierung diente das Housekeeping-gen β -Aktin.

4.1.1 Expression von MDMX nach Behandlung mit Cisplatin

Zur Untersuchung des Spleißens von MDMX sollte im Zeitverlauf eine geeignete Behandlungszeit bestimmt werden. Es wurden 100000 OAW-42 Zellen in 6-Well-Platten eingestreut. Diese inkubierten 24 h in 2 ml DMEM-Medium mit 5 % CO₂. Danach erfolgte die Behandlung mit 20 μ M Cisplatin (LD₅₀-Wert) für 2, 6, 10, 18 und 24 Stunden. Die Isolation erfolgte wie unter 3.2.4 beschrieben.

Der gesamte Leserahmen der MDMX-mRNA ist wie oben beschrieben amplifiziert worden. Es zeigt sich im Zeitverlauf bereits nach 6-stündiger Behandlung mit Cisplatin ein verstärktes Spleißen verkürzter Transkripte der MDMX-mRNA (Abb. 4-2 A). Nach 18 h Behandlung mit Cisplatin sind ausschließlich verkürzte Transkripte nachweisbar. Eine bekannte verkürzte Transkriptvariante von MDMX ist MDMX-S. Dieser Transkriptvariante ist das Exon 6 alternativ herausgespleißt. Das Verhältnis der MDMX-S-mRNA zum FL-MDMX-Transkript ist ein negativer prognostischer Marker in einigen Tumorgeweben [Rallapalli et al. 1999, Bartel et al. 2005, Jochemsen et al. 2010, Liu et al. 2012]. Darüber hinaus zeigt das verstärkte Auftreten dieser wichtigen Transkriptvariante nach einer Cisplatin Behandlung die Aktivierung von Signalkaskaden an, als Reaktion der Zellen nach einem DNA-Schaden. Aus diesen Gründen wurde das Herausspleißen von Exon 6 hier näher betrachtet. Nach 6-stündiger Cisplatin Behandlung sind bereits verstärkt Transkripte mit deletiertem Exon 6 detektierbar. Die Inkubation der Zellen für 18 h mit Cisplatin führt zur verstärkten Bildung von Transkripten ohne Exon 6 im Vergleich zu Transkripten mit Exon 6 (Abb. 4-2 B und D). Die Behandlung der OAW-42 Zellen mit Cisplatin für 18 Stunden stellt, auf Grund erhöhter Spleißaktivität, eine geeignete Inkubationszeit dar.

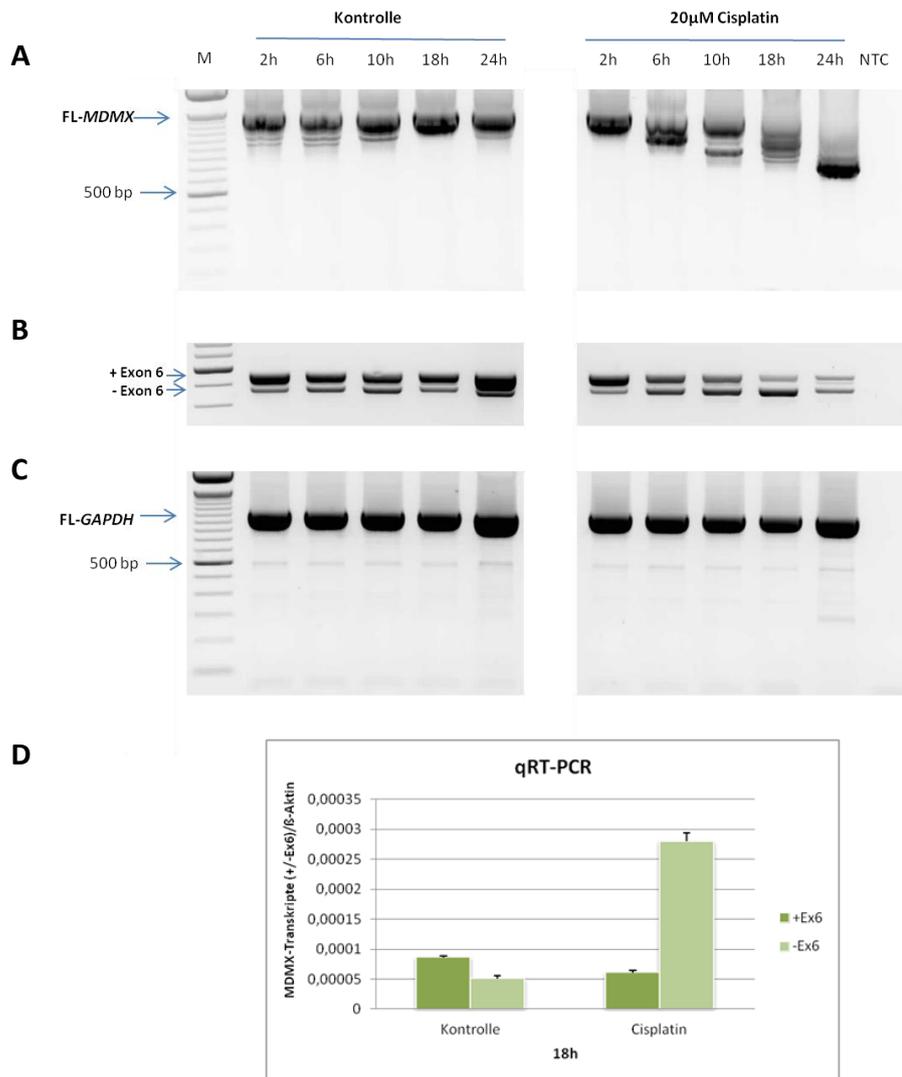


Abb. 4-2: Behandlung der OAW-42 Zellen mit 20 μ M Cisplatin

A Die Expression des gesamten Leser Rahmens der MDMX-mRNA ist zu den Zeitpunkten 2 h, 6 h, 10 h, 18 h und 24 h dargestellt. **B** stellt die PCR zur Ermittlung des Verhältnisses von Transkripten mit (+Exon 6) und ohne Exon 6 (-Exon 6) dar. In **C** ist die Expression von full-length GAPDH (FL-GAPDH), als Beispiel für eine nicht alternativ gespleißte mRNA gezeigt. **D** stellt mittels quantitativer Real-Time PCR das Verhältnis von Transkripten mit und ohne Exon 6 nach 18 h Cisplatin Behandlung dar. Es wurden die Kopien pro μ l gemessen und mit den erhaltenen Kopien des Housekeepinggens β -Aktin zur Normierung ins Verhältnis gesetzt. (M = 100 bp-Leiter, NTC = negativ Kontrolle)

Die verstärkte Bildung verkürzter Transkripte der MDMX-mRNA nach Behandlung der OAW-42 Zellen mit Cisplatin geht mit der Reduktion des MDMX-Proteinlevels einher (Abb. 4-3 A). Die Gesamttranskriptmenge der MDMX-mRNA bleibt aber nahezu gleich (Abb. 4-3 B). Es ist daher zu vermuten, dass Cisplatin einen Einfluss auf die Spleißaktivität hat. Die Beeinflussung des Spleißens der MDMX-mRNA führt zwar zur Entstehung verkürzter Transkripte, aber die Transkriptionsrate der MDMX-mRNA bleibt dabei konstant.

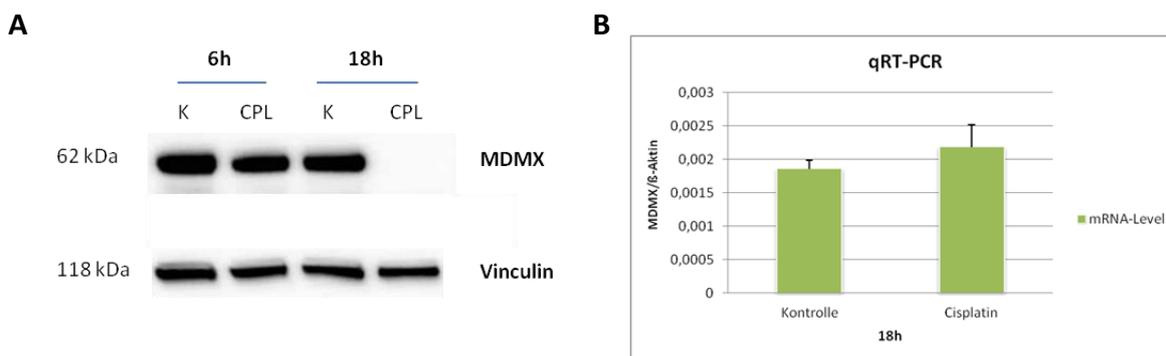


Abb. 4-3: Expression des Proteinlevel und der Gesamttranskriptmenge von MDMX nach Behandlung mit Cisplatin

A zeigt die Proteinexpression von MDMX in OAW-42 Zellen in unbehandelten (K) und Cisplatin behandelten (CPL) OAW-42 Zellen. In **B** ist die Gesamttranskriptmenge (mRNA-Level) der MDMX-mRNA mittels quantitativer Real-Time PCR analysiert worden. Die Expression der β -Aktin-mRNA diente als Normierungs-grundlage. Die Gesamttranskriptmenge ist im Verhältnis zur β -Aktin-mRNA dargestellt.

OAW-42 Zellen zeigten nach Behandlung mit 20 μ M Cisplatin (LD_{50} -Wert, WST-Tests siehe Anhang) und einer Inkubationszeit von 18 Stunden eine starke Veränderung im Spleißen der MDMX-mRNA. Unter Zuhilfenahme zweier Konzentrationen kleiner dem LD_{50} -Wert (1 und 5 μ M) sollte untersucht werden, ob auch niedrigere Konzentrationen zum Entstehen verkürzter Transkripte der MDMX-mRNA führen. Die Behandlung der OAW-42 Zellen mit 1 und 5 μ M Cisplatin führt nicht zur Bildung verkürzter Transkripte (Abb. 4-4 A). Erst die Behandlung mit 20 μ M zeigt die, bereits beschriebene, erhöhte Spleißaktivität. Die Gesamttranskriptmenge (mRNA-Level) der MDMX-mRNA bleibt bei allen Konzentrationen annähernd gleich (Abb. 4-4 D). Die verstärkte Bildung von Transkripten ohne Exon 6 kann bereits ab einer Konzentration von 5 μ M detektiert werden. Das vermehrte Herausspleißen von Exon 6 und die damit verbundene Umkehrung des Verhältnisses von Transkripten mit und ohne Exon 6 ist aber erst nach 18-stündiger Behandlung mit 20 μ M Cisplatin nachweisbar (Abb. 4-4 B und D). Daraus lässt sich schließen, dass das Entstehen verkürzter Transkripte durch erhöhtes alternatives Spleißen konzentrationsabhängig ist.

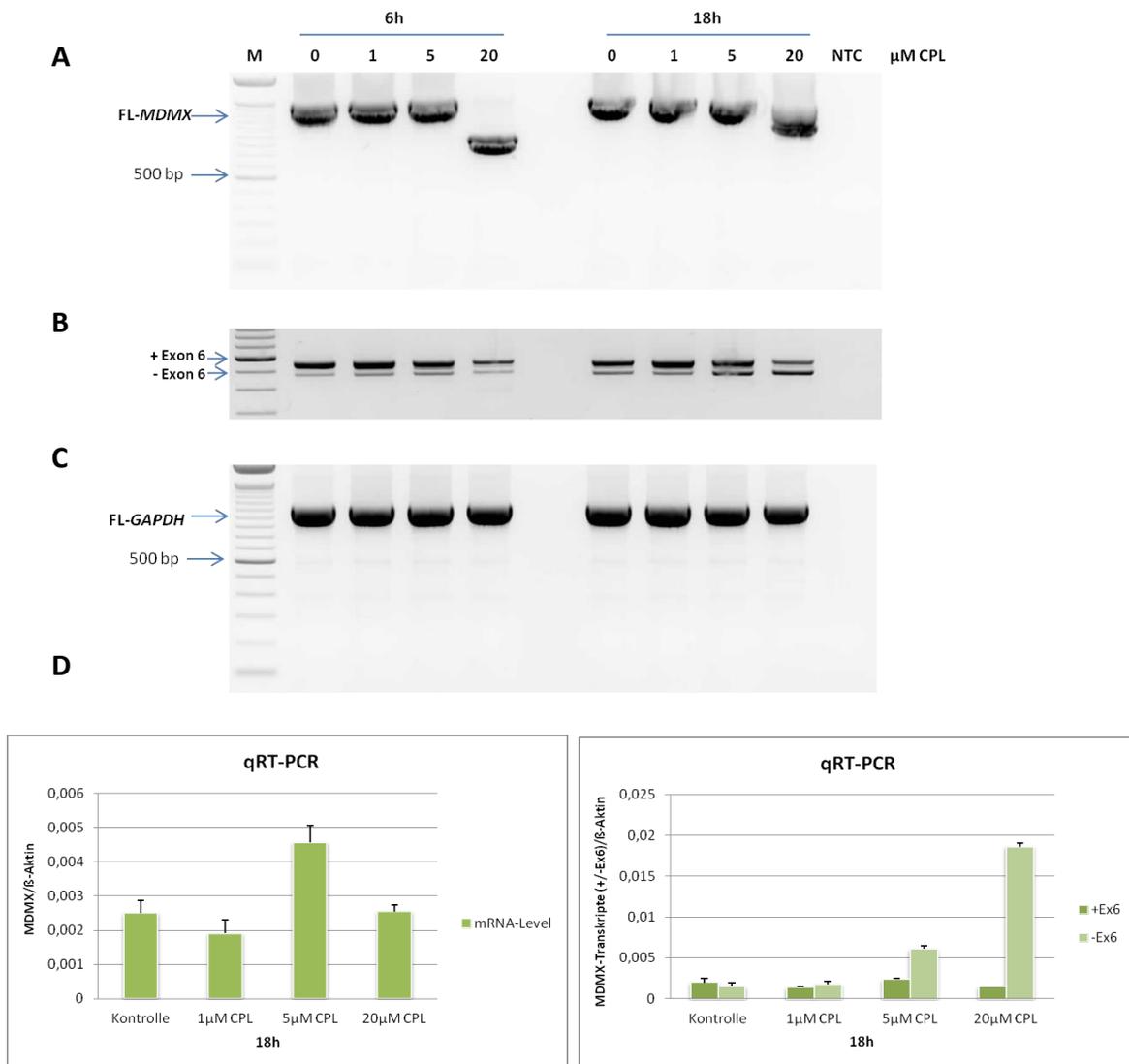


Abb. 4-4: Behandlung der OAW-42 Zellen mit verschiedenen Cisplatin Konzentrationen

A OAW-42 Zellen wurden mit 1, 5 und 20 μM Cisplatin (CPL) behandelt. Die Expression des gesamten Leserahmens der MDMX-mRNA ist zu den Zeitpunkten 6 und 18 Stunden dargestellt. **B** stellt die PCR zur Ermittlung des Verhältnisses von Transkripten mit (+Exon 6) und ohne Exon 6 (-Exon 6) dar. In **C** ist die Expression von full-length GAPDH (FL-GAPDH), als Beispiel für eine nicht alternativ gespleißte mRNA gezeigt. **D** stellt mittels quantitativer Real-Time PCR die Gesamttranskriptmenge (mRNA-Level) der MDMX-mRNA (links) und das Verhältnis von Transkripten mit und ohne Exon 6 nach 18 h Cisplatin Behandlung dar (rechts). Es wurden die Kopien pro μl gemessen und mit den erhaltenen Kopien des Housekeepinggens β-Aktin zur Normierung ins Verhältnis gesetzt. (M = 100 bp-Leiter, NTC = negativ Kontrolle)

4.1.2 Einfluss von Cisplatin auf das Spleißen der MDMX-mRNA

Zur Untersuchung des Einflusses von Cisplatin auf das Spleißen der MDMX-mRNA wurden die Banden der 18 h Kontrolle und 18 h Cisplatin Probe, die nach Amplifikation der FL-MDMX-mRNA entstanden sind, analysiert (Abb. 4-2 A). Die Banden wurden ausgeschnitten und aus dem Agarosegel gereinigt. Danach erfolgten die Klonierung der Produkte, das Picken

positiver Klone und die Isolation der Plasmide. Anschließend wurde mittels Sequenzierung ermittelt, welche Transkriptvarianten entstanden sind.

Es konnten durch die Sequenzierungen 10 alternativ (Abb. 4-5) und 3 aberrant (Abb. 4-6) gespleißte Transkriptvarianten bestimmt werden. Die alternativ gespleißten Transkripte lassen sich in 3 Gruppen teilen. Vier Transkripte besitzen nur die p53-Bindedomäne (p53-BD) und sind daher wahrscheinlich in der Lage, an den Transkriptionsfaktor p53 zu binden. Dadurch kann die durch p53-vermittelte Genexpression stärker inhibiert werden [Rallapalli et. al 1999]. Den Transkripten MDMX-S, MDMX- Δ E6_ Δ E8-9 und MDMX- Δ E6_ Δ E9 wird alternativ das Exon 6 herausgespleißt, wodurch es zu einer Leserahmenverschiebung und einem vorzeitigen Stoppkodon im Exon 7 kommt. Somit kodieren die drei Transkriptvarianten für das gleiche Protein. Die Deletion der Exone 8 und 9 hätte bei der Translation in ein Protein keine Bedeutung. Die Transkriptvariante MDMX-Alt1 unterscheidet sich dahingehend von den anderen drei Varianten dieser Gruppe, dass bei MDMX-Alt1 die Exone 6-9 alternativ herausgespleißt werden. Dadurch kommt es zur Leserahmenverschiebung und zu einem vorzeitigen Stoppkodon im Exon 10. Der Unterschied zwischen dieser Variante und den vorher beschriebenen Transkripten besteht ausschließlich in den veränderten Aminosäuren, die durch die Leserahmenverschiebung im Exon 7 (MDMX-S, MDMX- Δ E6_ Δ E8-9 und MDMX- Δ E6_ Δ E9) bzw. Exon 10 (MDMX-Alt1) entstehen.

Die zweite Gruppe bilden Transkripte mit vorhandener Zink-Finger- und RING-Domäne. Über die RING-Domäne ist FL-MDMX in der Lage, an MDM2 zu binden. Solche Heterodimere sind stabiler als MDM2-Homodimere und können p53 effektiver ubiquitinylieren und für den proteasomalen Abbau markieren [Sharp et al. 1999, Tanimura et al. 1999]. Somit lässt sich die Aktivität von p53 auch auf diese Weise regulieren. Zu dieser Gruppe gehören die Transkriptvarianten MDMX-Alt2 und MDMX- Δ E5-9. Bei beiden Varianten werden mehrere Exone alternativ herausgespleißt. MDMX-Alt2 fehlen die Exone 4-9 und MDMX- Δ E5-9 die Exone 5-9 komplett. Der Leserahmen wird bei keiner Variante verändert, und jede kodiert für ein anderes Protein. Somit besteht bei beiden Proteinen die Möglichkeit, dass diese ebenfalls über deren RING-Domäne an MDM2 binden könnten. Solche Heterodimere hätten vermutlich ähnliche Funktionen wie die FL-MDM-Heterodimere.

Die weiteren vier alternativ gespleißten Transkripte (MDMX- Δ E4_ Δ E6, MDMX- Δ E4_ Δ E6-9, MDMX- Δ E4_ Δ E6_ Δ E8-9 und MDMX- Δ E5-7_ Δ E9) bilden die dritte Gruppe. Diese Transkript-

varianten besitzen durch erhöhtes Exon Skipping keine funktionelle Domäne. Die Translation in ein Protein ist bei diesen vier Transkriptvarianten nicht zu vermuten. Somit könnten solche Varianten gebildet werden, um die FL-MDMX Transkriptmenge zu senken. Dadurch würde das MDMX-Proteinlevel herabgesetzt und dies hätte ebenfalls Auswirkung auf das MDMX-MDM2-p53 Gleichgewicht.

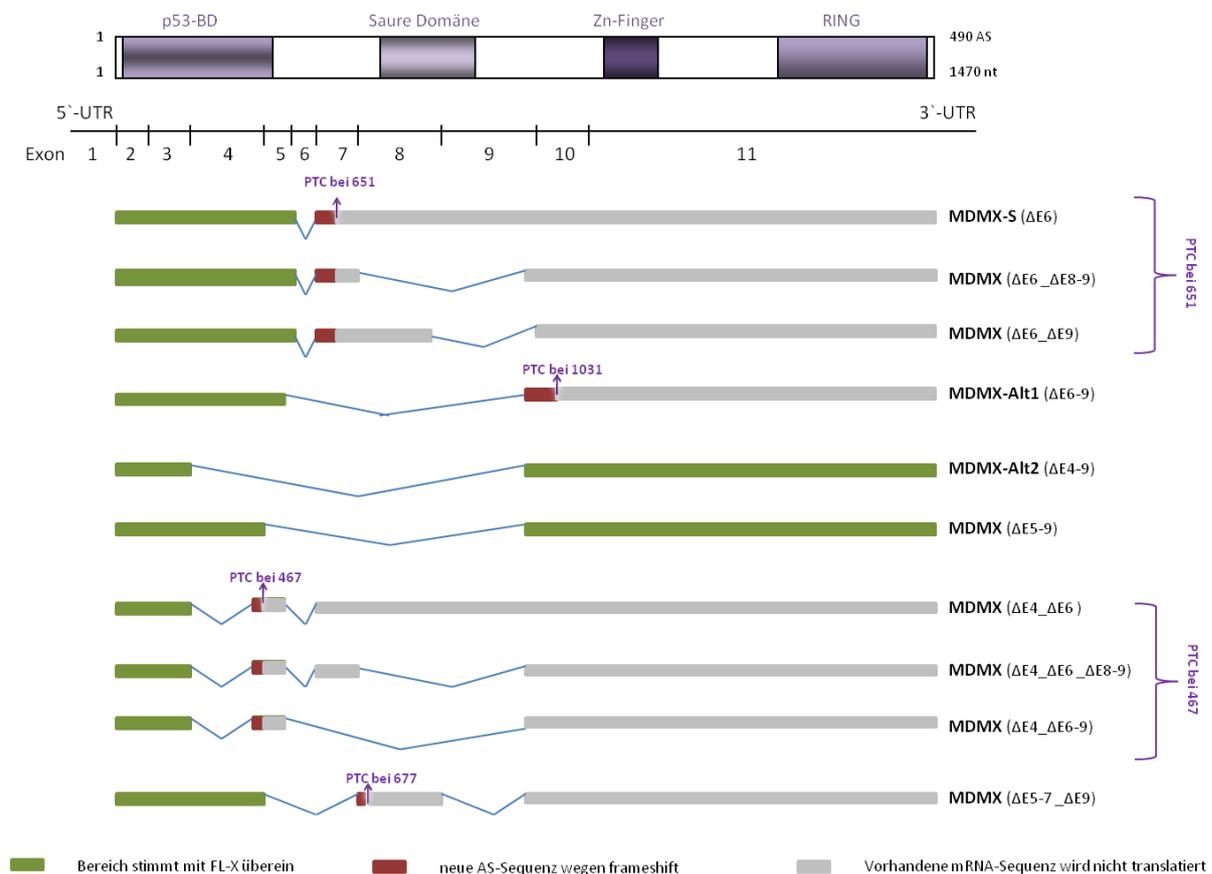


Abb. 4-5: Übersicht der nach Sequenzierung erhaltenen alternativ gespleißten Transkripte

Es erfolgte eine Behandlung der OAW-42 Zellen mit Cisplatin für 18 h. Die Banden der Kontroll- und Cisplatin-Proben wurden ausgeschnitten, aus dem Agarosegel gereinigt, kloniert und die erhaltenen Plasmide sequenziert. (PTC = vorzeitiges Stoppkodon, AS = Aminosäure)

Neben den alternativ gespleißten Transkripten konnten auch drei aberrant gespleißte Transkripte detektiert werden (Abb. 4-6). Einer Variante fehlt ein Teil von Exon 11. Durch die Deletion der Nukleotide 1117-1220 der MDMX-mRNA kommt es zur Leserahmenverschiebung und zu einem vorzeitigen Stoppkodon im Exon 11 (PTC bei 1296). Diese Sequenz wurde auf zusätzliche Spleißstellen im Exon 11 überprüft unter Zuhilfenahme der Internetseite http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html (Stand 25.01.2013). Es konnte nur eine neue 5`Donorstelle bestimmt werden. Somit könnte das Spleißen des 104 nt großen

Fragments ein Artefakt sein, welches durch fehlerhaftes Spleißen entsteht. Den beiden anderen Varianten fehlt nur ein Teil von Exon 6 und einer der beiden Varianten zusätzlich ein Teil im Exon 9. Durch die Deletion der Nukleotide zwischen Position 506 und 534 im Exon 6 der MDMX-mRNA kommt es zur Leserahmenverschiebung und zum vorzeitigen Stoppkodon im Exon 6 (PTC bei 569). Somit kodieren beide Varianten nur für die p53-BD und könnten, ebenso wie die Transkriptvarianten der ersten Gruppe der alternativ gespleißten Transkripte, an p53 binden und dessen transkriptionelle Aktivität hemmen. Zum Entstehen der aberrant gespleißten Varianten wird eine 3`Akzeptorstelle genutzt, die als potentielle Spleißstelle durch die oben genannte Internetseite angezeigt wird.

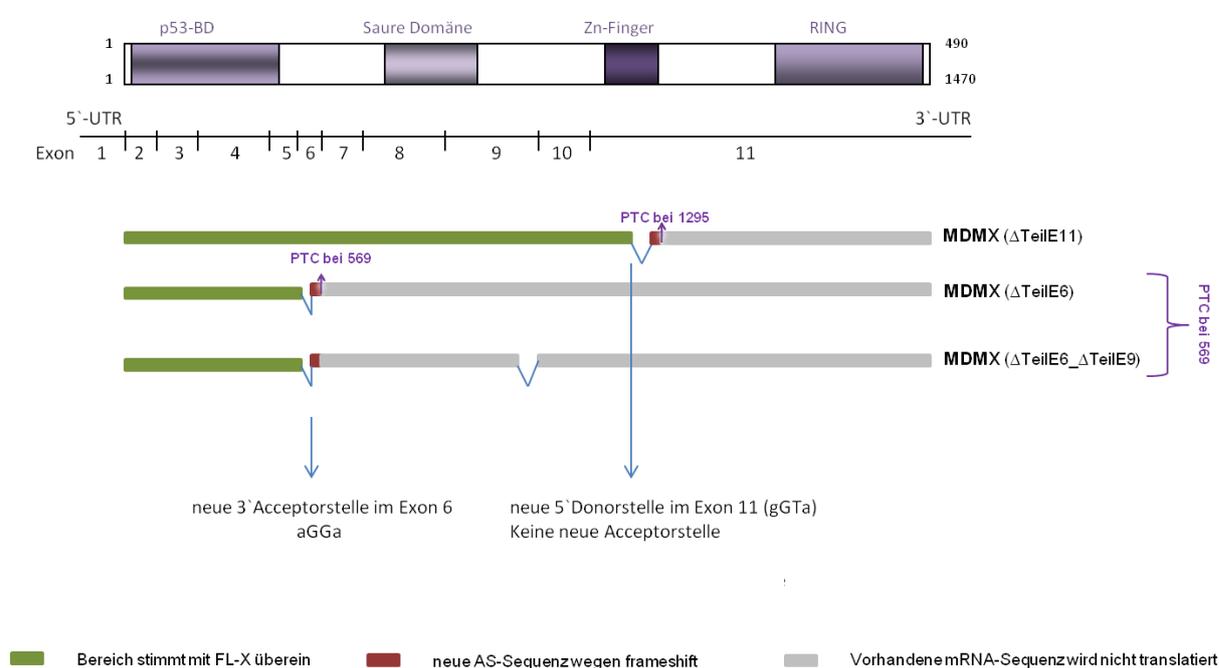


Abb. 4-6: Übersicht der nach Sequenzierung erhaltenen aberrant gespleißten Transkripte

Es erfolgte eine Behandlung der OAW-42 Zellen mit Cisplatin für 18 h. Die Banden der Kontroll- und Cisplatin-Proben wurden ausgeschnitten, aus dem Agarosegel gereinigt, kloniert und die erhaltenen Plasmide sequenziert. (PTC = vorzeitiges Stoppkodon, AS = Aminosäure)

Um einen Zusammenhang zwischen der Wirkung des Zytostatika Cisplatin und dem Spleißen der MDMX-mRNA zu erkennen, wurden die erhaltenen Transkripte zuerst der Behandlung zugeordnet und anschließend nach vorhandenen Domänen sortiert (Abb. 4-7). Sowohl in der unbehandelten Kontrolle, als auch in der mit Cisplatin behandelten Probe konnten Transkriptvarianten ohne funktionelle Domäne gefunden werden. Das Auftreten dieser Varianten in unbehandelten Zellen zeigt, dass solche verkürzten Transkripte nicht nur Artefakte nach einer Behandlung mit DNA-schädigendem Agens sind. Die Transkripte

MDMX-S und MDMX- $\Delta E6_{\Delta E8-9}$, die potentiell für das gleiche Protein kodieren, konnten in unbehandelten und Cisplatin behandelten Zellen gefunden werden. Auch MDMX- $\Delta E5-9$ konnte in beiden Proben detektiert werden. Die übrigen Transkriptvarianten sind entweder in den unbehandelten oder behandelten Zellen aufgetreten. Die aberrant gespleißten Transkripte MDMX- Δ TeilE6 und MDMX- $\Delta E6_{\Delta}$ TeilE9 gehören, wie MDMX-S und MDMX- $\Delta E6_{\Delta E8-9}$, zur Gruppe der Transkripte, die nur für die p53-BD kodieren. Diese konnten nur in den Kontrollen detektiert werden. Die Transkriptvarianten MDMX- $\Delta E6_{\Delta E9}$ und MDMX-Alt1 sind ausschließlich in den mit Cisplatin behandelten Proben erfasst worden. Auf Grund des gemeinsamen Auftretens einzelner verkürzter Transkriptvarianten in unbehandelten und Cisplatin behandelten Zellen, lässt sich noch nicht eindeutig sagen, welche Exone der MDMX-mRNA bevorzugt nach Cisplatin Behandlung gespleißt werden.

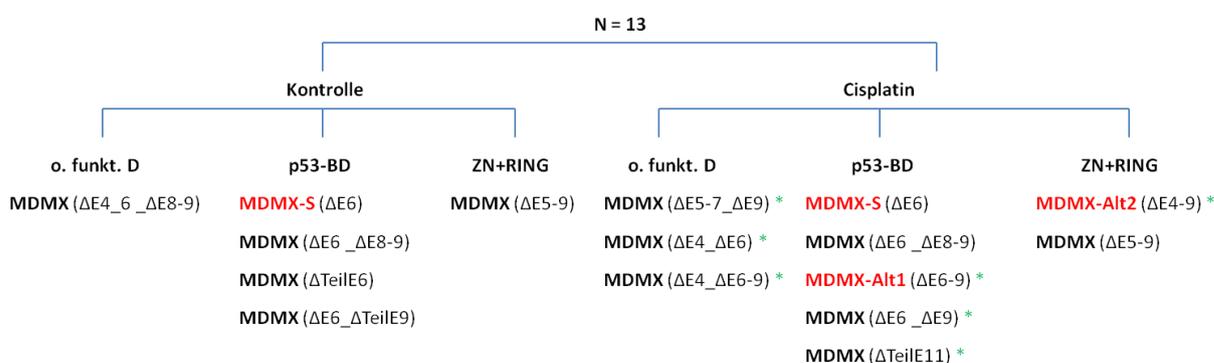


Abb. 4-7: Dargestellt sind die durch Sequenzierung ermittelten 13 Spleißvarianten der MDMX-mRNA

Die Spleißvarianten wurden zuerst der Probe zugeordnet, aus welcher diese stammte. Im zweiten Schritt sind diese Varianten nach vorhandenen funktionellen Domänen sortiert worden. Rot markiert sind solche Varianten, die bereits durch die eigene und andere Gruppen beschrieben wurden. Ebenfalls markiert (*) sind solche Varianten, die ausschließlich in den Cisplatin behandelten OAW-42 Zellen gefunden wurden. (o.funkt.D. = ohne funktionelle Domäne)

Aus diesem Grund sind die Transkriptvarianten in vier Gruppen eingeteilt worden. Die erste Gruppe umfasste ausschließlich die FL-MDMX-mRNA. Die anderen drei Gruppen bilden solche Transkripte, denen das Exon 4, 6 oder 9 alternativ gespleißt wurde. Transkriptvarianten, denen z.B. Exon 6 und 9 herausgespleißt wurden, sind beiden Gruppen zugeordnet worden. Als Grundlage dienten 32 gepickte Klone der unbehandelten Proben (Kontrolle) und 30 Klone der mit Cisplatin behandelten Proben. Es wurden, ausgehend von 3 unabhängigen Zellkulturversuchen, jeweils ca. 10 Klone pro Versuchsansatz gepickt.

Rund 41 % der erhaltenen Plasmide aus den unbehandelten Proben (Kontrolle) enthielten die FL-MDMX-mRNA. Nach Behandlung der Zellen mit Cisplatin sind nur 2 % der Plasmide mit dieser Sequenz vorhanden gewesen (Abb. 4-8 A). Ein erhöhtes Herausspleißen der Exone 4, 6 und 9 ist nach Cisplatin Behandlung zu beobachten. Nach Behandlung der Zellen mit Cisplatin entstehen 8 % mehr Transkripte denen das Exon 4 (Δ Ex4), 7 % denen Exon 6 (Δ Ex6) und 24 % denen Exon 9 (Δ Ex9) gespleißt wurde. Die verminderte Bildung der FL-MDMX-mRNA in den OAW-42 Zellen nach Cisplatin Behandlung und das verstärkte Auftreten von Exon Skipping zeigt die Veränderung im Spleißen nach DNA-Schädigung.

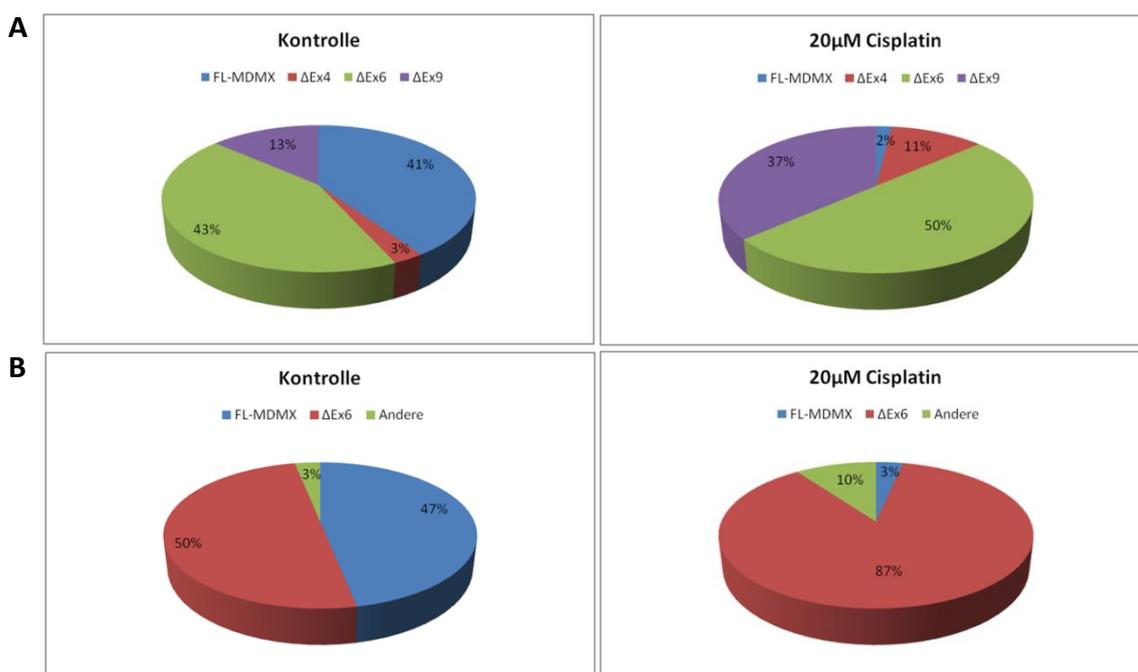


Abb. 4-8: Kreisdiagramm zur prozentualen Darstellung der alternativ gespleißten Transkripte

In **A** sind die am häufigsten gespleißten Exone dargestellt und **B** zeigt den Vergleich solcher Transkripte, denen Exon 6 fehlt im Vergleich zur FL-MDMX mRNA.

In nahezu jeder ermittelten Transkriptvariante wurde das Exon 6 herausgespleißt. Am häufigsten trat die Variante MDMX- Δ E6_ Δ E8-9 auf. Daher wurden die Transkriptvarianten ein weiteres Mal sortiert. Es sind drei Gruppen gebildet worden. Die erste Gruppe umfasste die FL-MDMX-mRNA. Die zweite Gruppe bildeten die Transkripte denen Exon 6 fehlte und die dritte enthielt alle anderen Varianten (Abb. 4-8 B). Der Anteil solcher Transkripte denen Exon 6 alternativ gespleißt wurde steigt von 50 % in den Kontrollen auf 87 % in den mit Cisplatin behandelten Zellen. Dieses starke Skipping eines einzelnen Exons nach einer

Cisplatin Behandlung zeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen einer DNA-Schädigung und dem alternativen Spleißen der MDMX-mRNA gibt.

Im weiteren Verlauf sollte mittels eines zweiten DNA-schädigenden Agens (Camptothecin) überprüft werden, ob erhöhtes Exon Skipping der MDMX-mRNA allgemein nach DNA-Schädigung stattfindet.

4.1.3 Expression von MDMX nach Behandlung mit Camptothecin

Zur Ermittlung einer geeigneten Konzentration zur Analyse des verstärkten Spleißens verkürzter Transkripte der MDMX-mRNA wurden die OAW-42 Zellen mit den LD₅₀-Werten des Camptothecins, die nach 24 h (2 µM) und 48 h (0,5 µM, WST-Tests siehe Anhang) ermittelt wurden und einer höheren Konzentration (LD₄₀-Wert = 8 µM) behandelt. Es zeigte sich erst nach 24-stündiger Behandlung mit 8 µM Camptothecin ein Auftreten verkürzter Transkripte der MDMX-mRNA und eine Reduktion der FL-MDMX-mRNA (Abb. 4-9 A). Das verstärkte Herausspleißen von Exon 6 konnte bereits ab 0,5 µM Camptothecin Behandlung beobachtet werden. Aber erst die Behandlung mit 8 µM Camptothecin führte zur Änderung des Verhältnisses von Transkripten mit und ohne Exon 6 im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4-9 B und D). Nach 24-stündiger Behandlung der OAW-42 Zellen mit 8 µM Camptothecin sind die Amplikons (Transkripte mit bzw. ohne Exon 6) nur schwach detektierbar, was auf eine Reduktion des MDMX-mRNA-Levels hindeutet. Die Gesamttranskriptmenge (mRNA-Level) der MDMX-mRNA steigt aber im Vergleich zur Kontrolle an (Abb. 4-9 D, links). Daher lässt sich vermuten, dass die schwache Expression dieser Produkte (Abb. 4-9 B) aufgrund erhöhten Spleißens jener Exone kommt, die für die Primerbindung während der PCR benötigt werden. Die Untersuchungen zum Spleißen der MDMX-mRNA nach Camptothecin Behandlung erfolgte somit in den OAW-42 Zellen nicht mit dem LD₅₀-Wert, sondern dem LD₄₀-Wert (8 µM) dieses Zytostatikums.

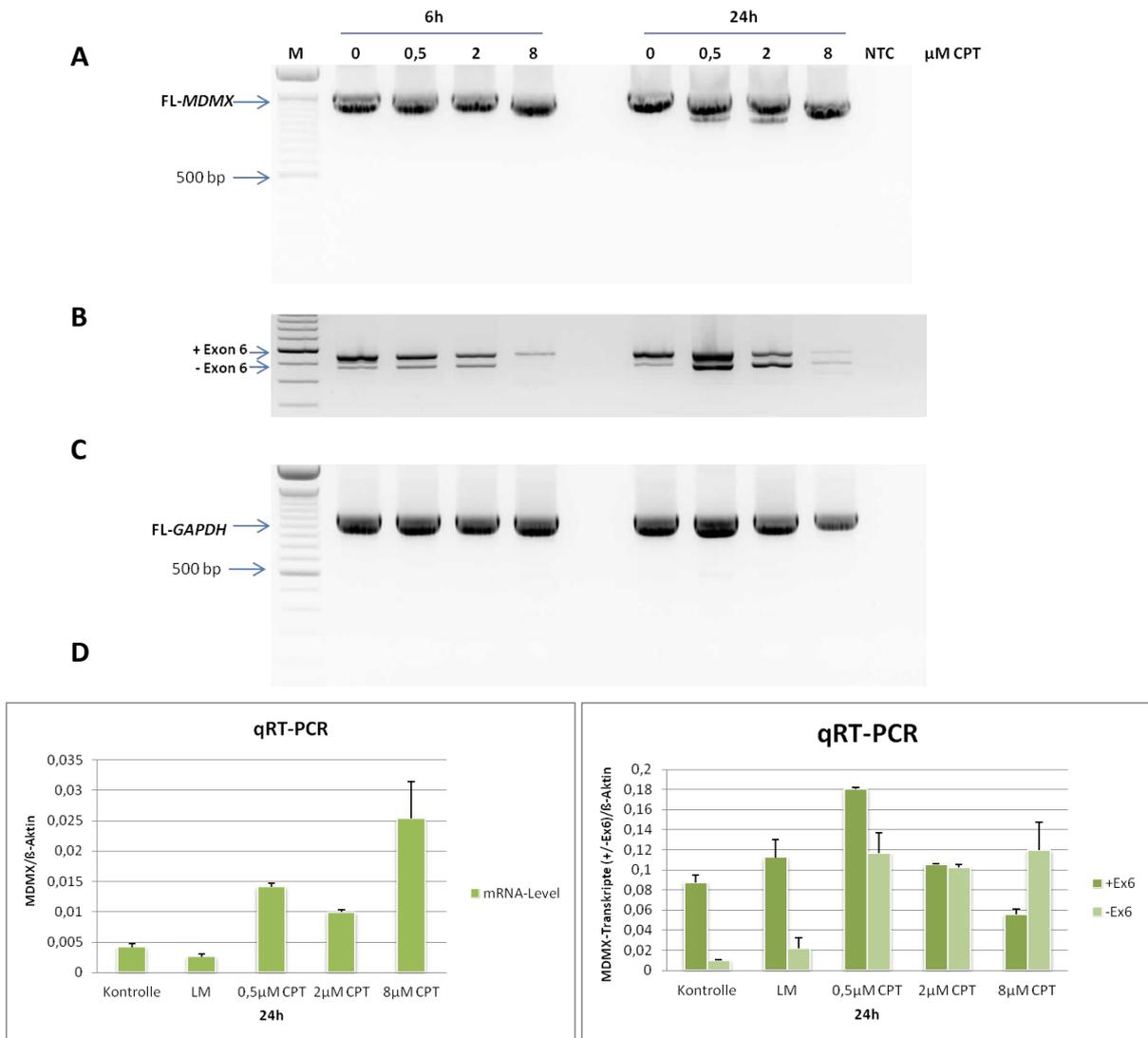


Abb. 4-9: Behandlung der OAW-42 Zellen mit verschiedenen Camptothecin Konzentrationen

Die OAW-42 Zellen wurden mit 0 (Lösungsmittelkontrolle); 0,5; 2 und 8 μM Camptothecin (CPT) behandelt. **A** Die Expression des gesamten Leserahmens der MDMX-mRNA ist zu den Zeitpunkten 6 und 24 Stunden dargestellt. **B** stellt die PCR zur Ermittlung des Verhältnisses von Transkripten mit (+Exon 6) und ohne Exon 6 (-Exon 6) dar. In **C** ist die Expression von full-length GAPDH (FL-GAPDH), als Beispiel für eine nicht alternativ gespleißte mRNA gezeigt. **D** stellt mittels quantitativer Real-Time PCR die Gesamttranskriptmenge der MDMX-mRNA (links) und das Verhältnis von Transkripten mit und ohne Exon 6 nach 24 h Camptothecin Behandlung dar (rechts). Es wurden die Kopien pro μl gemessen und mit den erhaltenen Kopien des Housekeepinggens β -Actin zur Normierung ins Verhältnis gesetzt. (M = 100 bp-Leiter, NTC = negativ Kontrolle, LM = Lösungsmittelkontrolle)

OAW-42 Zellen wurden nachfolgend mit 8 μM Camptothecin für 3-24 h behandelt. Es zeigte sich nach Amplifikation der MDMX-mRNA im Zeitverlauf ein verändertes Bandenmuster (Abb. 4-10 A). Bereits nach 10 h Behandlungszeit konnte das Entstehen verkürzter Transkripte der MDMX-mRNA beobachtet werden. Die FL-MDMX-mRNA ist kaum noch exprimiert. Es zeigte sich ebenfalls eine Abnahme solcher Transkripte mit Exon 6 und eine

Zunahme von Transkripten ohne Exon 6 im Zeitverlauf der Behandlung. Auffällig ist die starke Abnahme des MDMX-mRNA-Levels mit steigender Behandlungsdauer (Abb. 4-10 B).

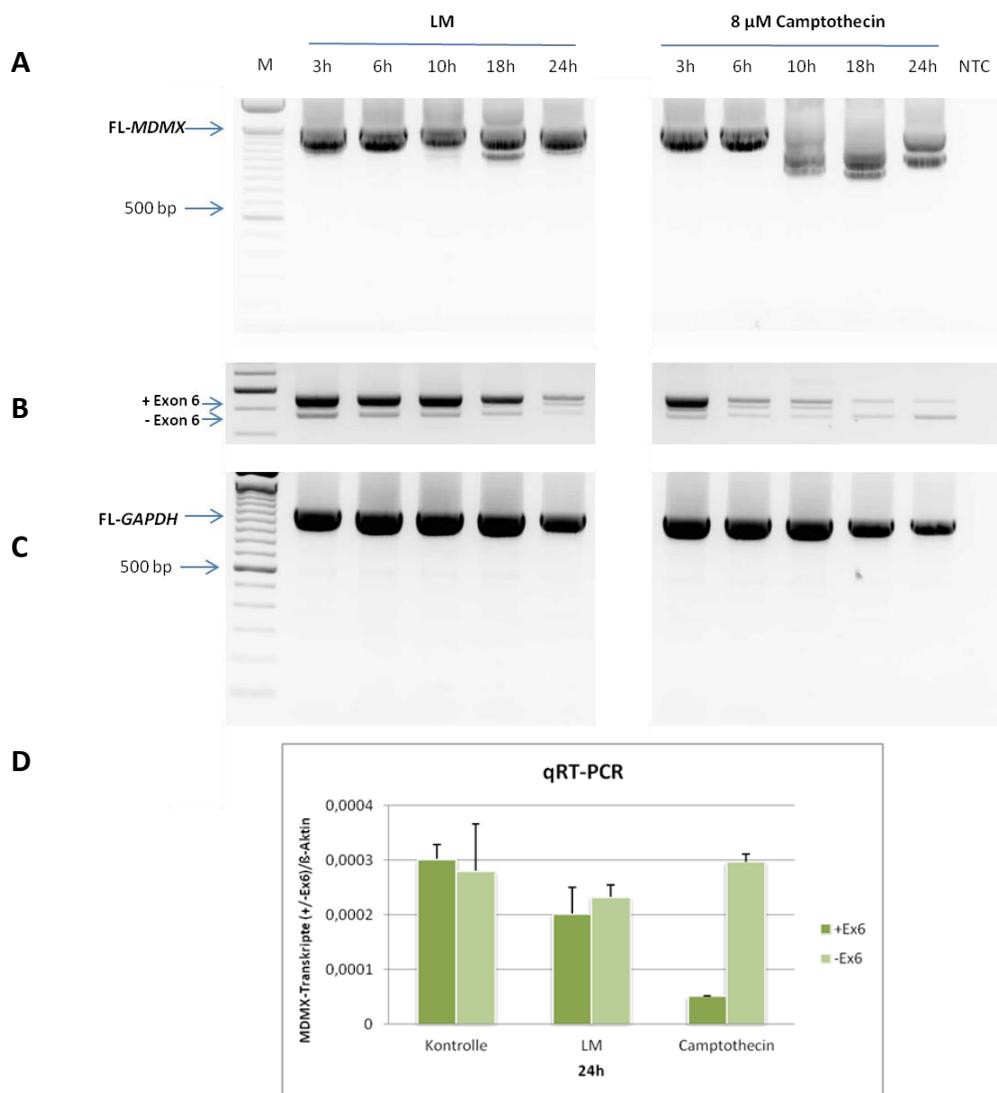


Abb. 4-10: Behandlung der OAW-42 mit 8 μ M Camptothecin

A Die Expression des gesamte Leserahmen der MDMX-mRNA ist zu den Zeitpunkten 3 h, 6 h, 10 h, 18 h und 24 h dargestellt. **B** Die PCR zur Ermittlung des verstärkten Auftretens von alternativem Spleißen erfolgte mittels spezifischer Primer, die das Verhältnis von Transkripten mit (+Exon 6) und ohne Exon 6 (-Exon 6) darstellen. In **C** ist die Expression von full-length GAPDH (FL-GAPDH), als Beispiel für eine nicht alternativ gespleißte mRNA gezeigt. **D** stellt mittels quantitativer Real-Time PCR das Verhältnis von Transkripten mit und ohne Exon 6 nach 18 h Cisplatin Behandlung dar. Es wurden die Kopien pro μ l gemessen und mit den erhaltenen Kopien des Housekeepinggens β -Aktin zur Normierung ins Verhältnis gesetzt. (M = 100 bp-Leiter, NTC = negativ Kontrolle, LM = Lösungsmittel)

Nach 24 h Camptothecin Behandlung konnte eine stärkere Expression von Transkripten ohne Exon 6 im Vergleich zu denen mit Exon 6 beobachtet werden (Abb. 4-10 B, D). Diese veränderte Expression konnte in den OAW-42 Zellen bereits nach 18-stündiger Behandlung mit 20 μ M Cisplatin gemacht werden. Dies deutet ebenfalls auf einen Zusammenhang

zwischen dem Spleißen von Exon 6 und der Schädigung der DNA, die durch Camptothecin entsteht, hin.

Die verstärkte Bildung verkürzter Transkripte der MDMX-mRNA nach Behandlung der OAW-42 Zellen mit Camptothecin ist wie nach einer Cisplatin Behandlung mit der Reduktion des MDMX-Proteinlevels verbunden (Abb. 4-11 A). Die Gesamttranskriptmenge der MDMX-mRNA steigt dabei leicht an (Abb. 4-11 B). Somit führt die Behandlung der OAW-42 Zellen sowohl mit Cisplatin als auch mit Camptothecin zur Reduktion des MDMX-Proteinlevels. Diese geht bei beiden Behandlungen nicht mit einem verminderten Gesamt-MDMX-mRNA-Level einher.

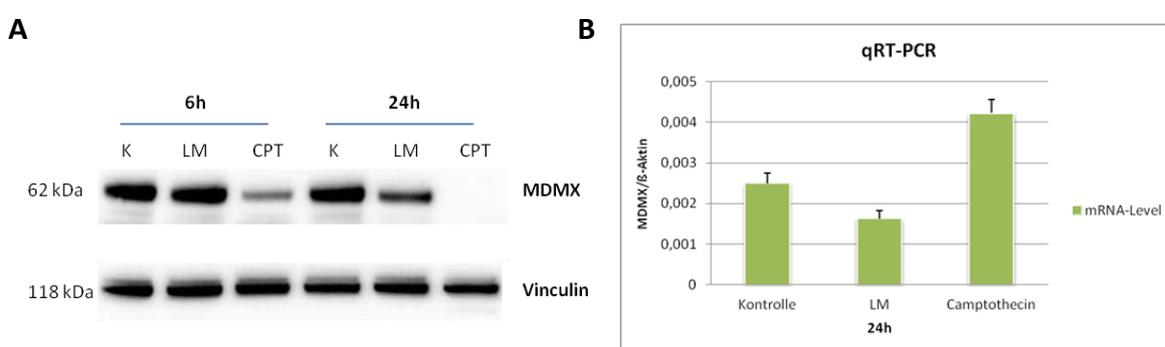


Abb. 4-11: Expression des Proteinlevel und der Gesamttranskriptmenge von MDMX nach Behandlung mit Camptothecin

A zeigt die Proteinexpression von MDMX in unbehandelten (K), Lösungsmittel- (LM) und Camptothecin behandelten (CPT) OAW-42 Zellen. In **B** ist die Gesamttranskriptmenge (mRNA-Level) der MDMX-mRNA mittels quantitativer Real-Time PCR analysiert worden. Die Expression der β -Aktin-mRNA diente als Normierungsgrundlage. Die Gesamttranskriptmenge ist im Verhältnis zur β -Aktin-mRNA dargestellt.

4.1.4 Einfluss von Camptothecin auf das Spleißen der MDMX-mRNA

Um zu überprüfen, welche Spleißvarianten nach Camptothecin Behandlung entstehen, wurden die Banden der Lösungsmittelkontrolle (LM) und der Camptothecin Behandlung nach 24 h ausgeschnitten, aus dem Gel isoliert, in Plasmidvektoren kloniert und diese anschließend sequenziert.

Es konnten fünf alternativ gespleißte und drei aberrant gespleißte Transkripte (Abb. 4-12 A und B) ermittelt werden. Die fünf alternativ gespleißten Transkripte besitzen alle die p53-BD und könnten somit an p53 binden und dessen transkriptionelle Aktivität hemmen [Rallapalli et al. 1999]. Die Transkriptvarianten MDMX-A und MDMX- Δ E8-9 besitzen hingegen zusätzlich die Zn-Finger- und RING-Domäne. Diese könnten ebenfalls über die

RING-Domäne Heterodimere mit MDM2 bilden. Über die Heterodimerbildung könnten die FL-MDM-Proteine p53 regulieren [Wang et al. 2012]. Vermutlich wären Heterodimere aus Transkriptvarianten ebenfalls funktionsfähige Dimere.

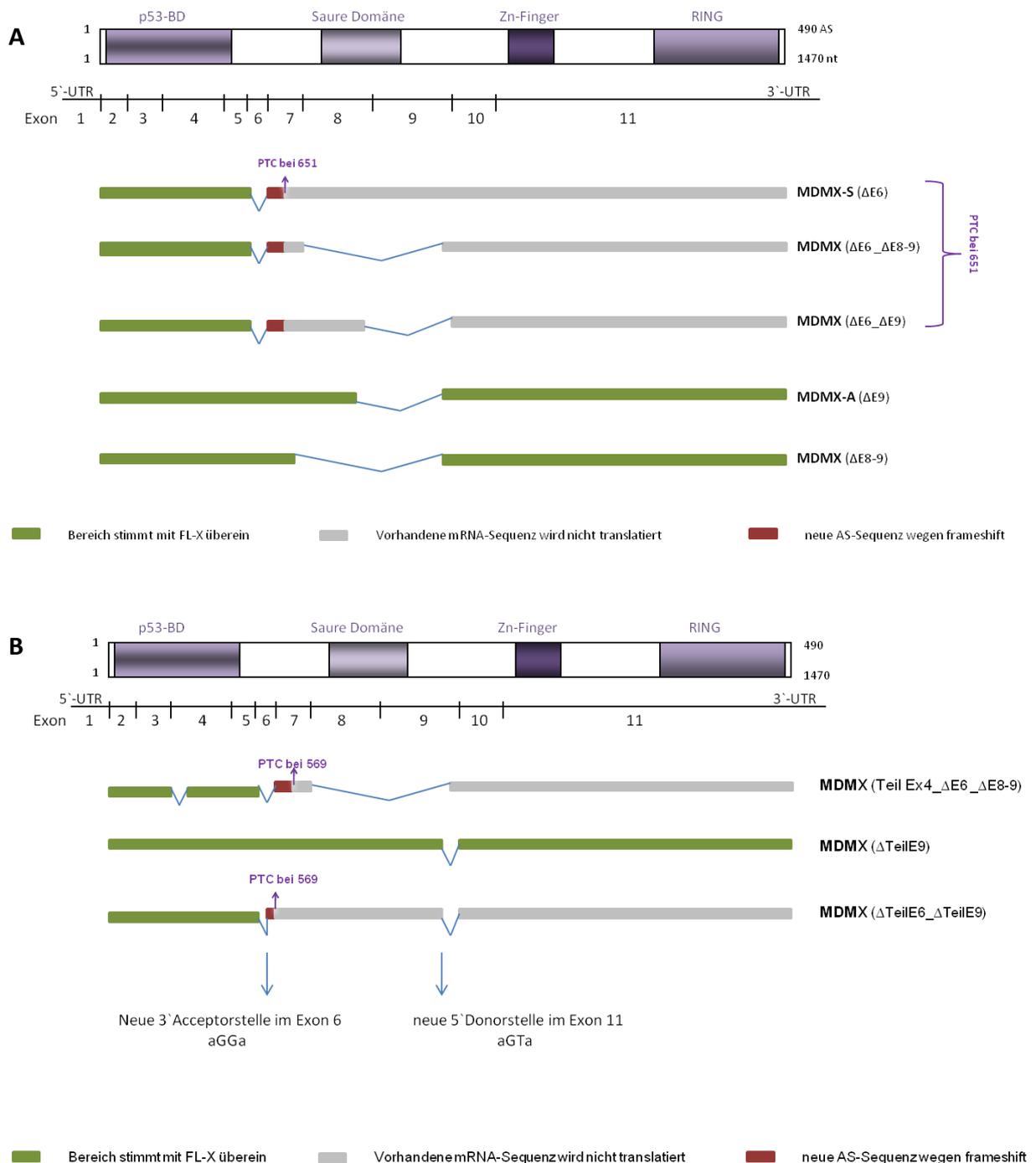


Abb. 4-12: Übersicht der nach Sequenzierung erhaltenen Transkripte

Es erfolgte eine Behandlung der OAW-42 Zellen mit Camptothecin für 24 h. Die Banden der Lösungsmittelkontroll- und Camptothecin-Proben wurden ausgeschnitten, aus dem Agarosegel gereinigt, kloniert und die erhaltenen Plasmide sequenziert. **A** stellt die alternativ und **B** die aberrant gespleißten Transkripte dar. (PTC = vorzeitiges Stoppkodon, AS = Aminosäure)

Bei der aberrant gespleißten Variante MDMX- Δ TeilE4_ Δ E6_ Δ E8-9 ist ein Teil von Exon 4 deletiert, was jedoch keinen Einfluss auf den Leserahmen hat. Dieser Sequenzbereich wurde auf zusätzliche Donor- und Akzeptorstellen, unter Zuhilfenahme der Internetseite http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html (Stand 25.01.2013), überprüft. Es zeigten sich keine potentiellen Spleißstellen. Durch das Fehlen von Exon 6 und des dadurch entstehenden vorzeitigen Stoppkodons (PTC bei 569) besitzt diese Variante keine funktionelle Domäne und wird somit wahrscheinlich nicht in ein Protein translatiert. Die Variante MDMX- Δ TeilE9 ist durch das Fehlen von 15 Nukleotiden von Exon 9 charakterisiert. Der Leserahmen wird nicht beeinträchtigt, weshalb potentiell alle Domänen vorhanden sind. Diese Variante könnte daher in ein Protein translatiert werden. Das dritte aberrant gespleißte Transkript entsteht unter Verwendung einer zusätzlichen 3`Akzeptorstelle im Exon 6 (MDMX- Δ TeilE6_ Δ TeilE9). Diese Transkriptvariante konnte in den Proben, die aus unbehandelten Zellen stammten, detektiert werden und ist bereits unter 4.1.1 beschrieben worden.

Es sollte ebenfalls überprüft werden, ob es einen Zusammenhang zwischen dem alternativen Spleißen der MDMX-mRNA und der Behandlung mit Camptothecin gibt. Hierfür wurden die Transkriptvarianten in Gruppen eingeteilt (Abb. 4-13 A). Die Einordnung der Transkripte wurde in Anlehnung an die Gruppierungen, der nach Cisplatin Behandlung erhaltenen Transkriptvarianten, getan (siehe 4.1.2, Abb. 4-8).

Insgesamt wurden 20 Klone der Lösungsmittelkontrollproben (LM) und 30 Klone der mit Camptothecin behandelten Proben untersucht. In den LM-Proben enthielten 18 % die FL-MDMX Sequenz. Nach Behandlung der Zellen mit Camptothecin konnte kein FL-MDMX detektiert werden. Es wurde ebenfalls das Skipping der Exone 4, 6 und 9 betrachtet. Keiner Transkriptvariante wurde Exon 4 herausgespleißt. Die Deletion von Exon 6 liegt sowohl in den Proben der Lösungsmittelkontrolle, als auch in den mit Camptothecin behandelten Zellen zu knapp 50 % vor. Die Verteilung der Transkripte, die aus mit Lösungsmittel behandelten OAW-42 Zellen stammten, ist vergleichbar mit denen aus unbehandelten Zellen (siehe 4.1.2). Somit kann ein Lösungsmittelinfluss ausgeschlossen werden. Exon 9 ist in 36 % der Transkripte, die in den Kontrollproben detektiert wurden, alternativ herausgespleißt. In den mit Camptothecin behandelten Zellen sind 16 % mehr Transkripte detektiert worden denen Exon 9 fehlte (Abb. 4-13 A).

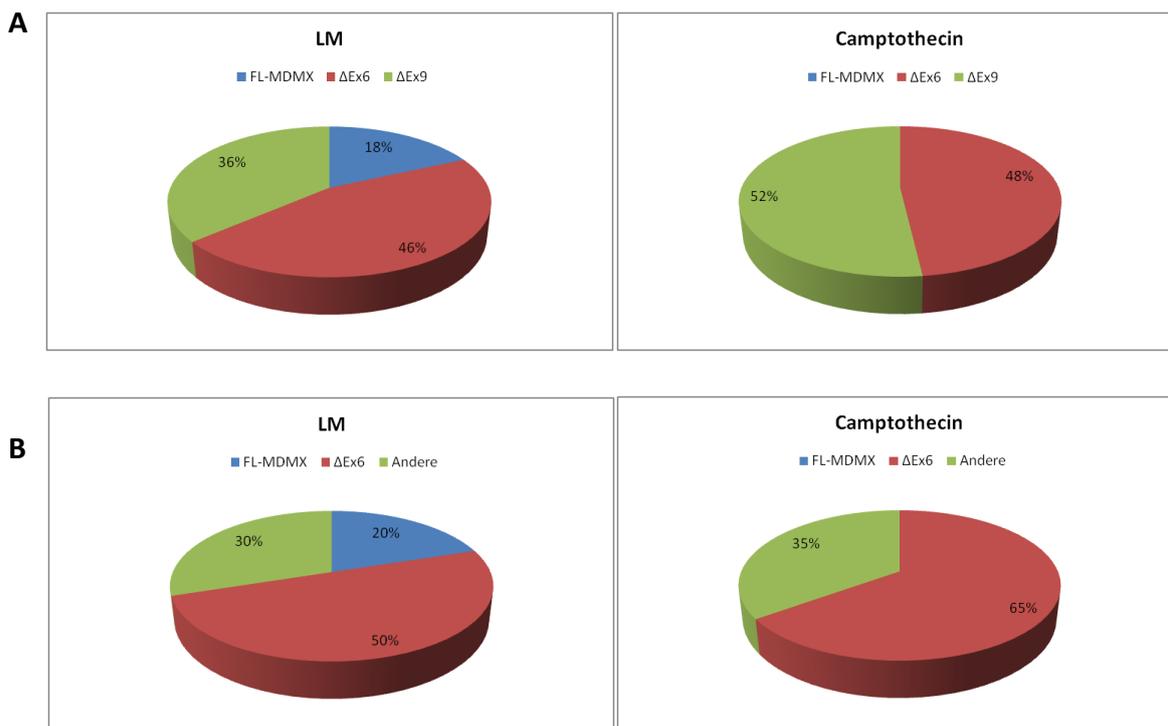


Abb. 4-13: Kreisdiagramm zur prozentualen Darstellung der alternativ gespleißten Transkripte

In **A** sind die am häufigsten gespleißten Exone dargestellt und **B** zeigt den Vergleich solcher Transkripte, denen Exon 6 fehlt im Vergleich zur FL-MDMX-mRNA. (LM = Lösungsmittel-Chlorophorm/Methanol)

Unter alleiniger Berücksichtigung des Herausspleißens von Exon 6 steigt die Anzahl der Transkripte mit deletiertem Exon 6 nach Camptothecin Behandlung um 15 % (Abb. 4-13 B). Dies ist vergleichbar mit dem Skipping von Exon 9 nach Camptothecin Behandlung. Die Verteilung zeigt, dass es sowohl in den mit Lösungsmittel behandelten Zellen, als auch mit Camptothecin behandelten Zellen bevorzugt zum Skipping der Exone 6 und 9 kommt. Jene Transkripte wurden nach Camptothecin Behandlung deutlich erhöht exprimiert. Ein Zusammenhang zwischen dem alternativen Spleißen dieser Exone und dem durch Camptothecin ausgelösten DNA-Schaden ist daher zu vermuten.

Auffällig war das fehlende Skipping von Exon 4 nach Camptothecin Behandlung. Mittels spezifischer Primer kann im Zeitverlauf gezeigt werden, dass die Behandlung mit Camptothecin nicht zum Herausspleißens von Exon 4 führt und somit einen Unterschied zur Cisplatin Behandlung darstellt (Abb. 4-14).

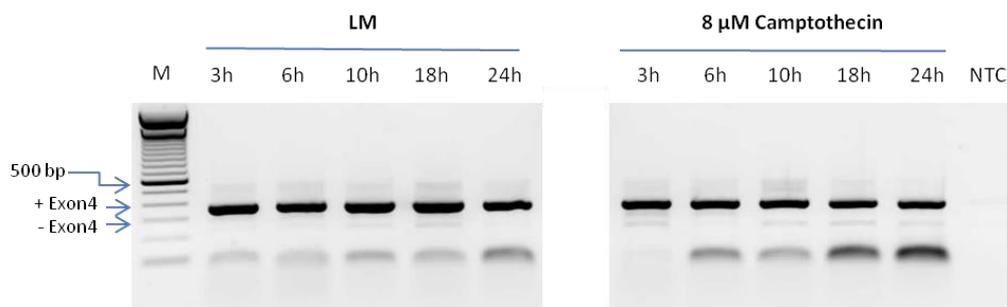


Abb. 4-14: Expression der MDMX-mRNA nach Camptothecin Behandlung

Dargestellt ist die Amplifikation von Transkripten mit und ohne Exon 4 mit den Primern MDMX-139 und X487rev nach Behandlung von OAW-42 Zellen mit Camptothecin. Die Auftrennung erfolgte in einem 2 %igen Agarosegel.

4.1.5 Überprüfung der Transkriptvariante MDMX-S auf einen möglichen Abbau durch den *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD)

Erhöhtes Skipping von Exon 6 nach Behandlung von OAW-42 Zellen mit DNA-schädigenden Agenzien führte vermehrt zur Bildung des MDMX-S-Transkripts. Die verstärkte Expression der MDMX-S-mRNA im Vergleich zur FL-MDMX-mRNA ist in verschiedenen Tumorgeweben ein negativer prognostischer Marker [Lenos et al. 2012]. Die Transkriptvariante MDMX-S ist charakterisiert durch ein vorzeitiges Stoppkodon im Exon 7. Transkripte, die ein vorzeitiges Stoppkodon (PTC) bilden, werden oftmals durch den NMD abgebaut. Der NMD ist ein Kontrollmechanismus, um mRNAs abzubauen, die z.B. potentiell in toxische Proteine translatieren. Durch den NMD können auch Halbwertszeiten von mRNAs verlängert bzw. verkürzt werden, um so die Bildung funktioneller Proteine zu beeinflussen [Schoenberg und Maquat, 2012].

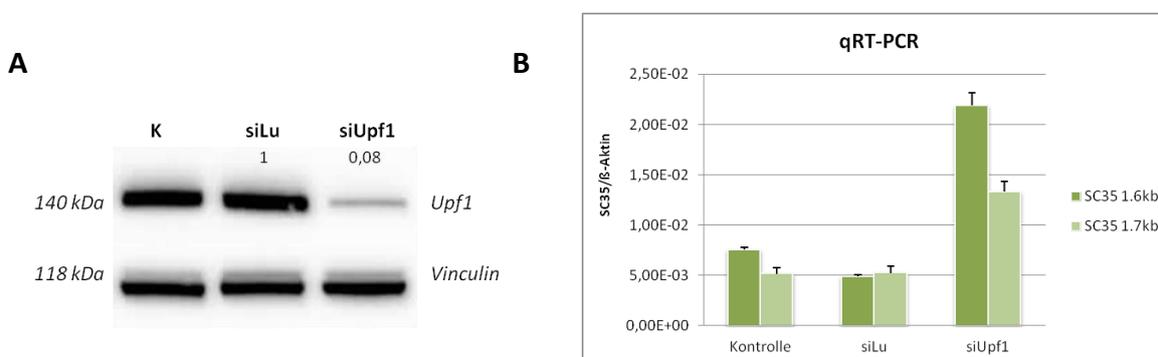


Abb. 4-15: Knockdown von Upf1 mit 100 nM siRNA für 72 h in OAW-42 Zellen

In **A** ist das Proteinlevel von Upf1 dargestellt. Die Zahlenwerte wurden mittels der Bio1D-Software ermittelt und stellen das Volumen der Bandenstärke von Upf1 dar. Vinculin diente hierbei zur Normierung. **B** zeigt die Expression der Upf1 abhängigen NMD Substrate SC35 1,6 kb und 1,7 kb mittels qRT-PCR. Die Expression der β -Aktin-mRNA diente als Normierungsgrundlage. Die Expression der beiden SC35 Transkripte ist im Verhältnis zur β -Aktin-mRNA dargestellt. (K = Kontrolle, siLu = siRNA gegen das Luciferasegen)

Die MDMX-S-mRNA könnte durch die Bildung des PTCs im Exon 7 ein Substrat des NMD sein. Des Weiteren konnte nach erstmaliger Beschreibung dieser Transkriptvariante durch Rallapalli et al. (1999) das endogene Protein nie detektiert werden. Um zu überprüfen, ob die MDMX-S-mRNA ein Substrat des NMD ist, wurde das Protein Upf1 in den OAW-42 Zellen mittels siRNA herunterreguliert. Upf1 ist ein zentrales Protein im NMD. Mendell et al. (2002 und 2004), sowie Gehring et al. (2003) konnten zeigen, dass ein Knockdown von Upf1 NMD Substrate stabilisiert. Ein Beispiel bilden die 1,6 kb und 1,7 kb SC35-mRNAs. Diese beiden mRNAs sind selbst Substrate des NMD und dienen daher als Kontroll-mRNAs für einen erfolgreichen Upf1-Knockdown und der damit verbundenen Inhibierung des NMD. Ein Upf1-Knockdown von über 90 % führt auf mRNA-Ebene zum Anstieg dieser SC35-mRNAs [Gehring et al. 2005].

OAW-42 Zellen wurden mit 100 nM siRNA gegen Upf1 für 72 h transfiziert. Anschließend erfolgte die RNA- und Proteinisolation. Es konnte eine Reduktion des Proteinlevel von über 90 % nach Knockdown der Upf1-mRNA erzielt werden (Abb. 4-15 A). Die vorausgesagte erhöhte Expression der NMD-Substrate (1,6 kb und 1,7 kb der SC35-mRNA) nach erfolgreichem Upf1-Knockdown konnte detektiert werden (Abb. 4-15 B). Folglich ist der NMD gehemmt.

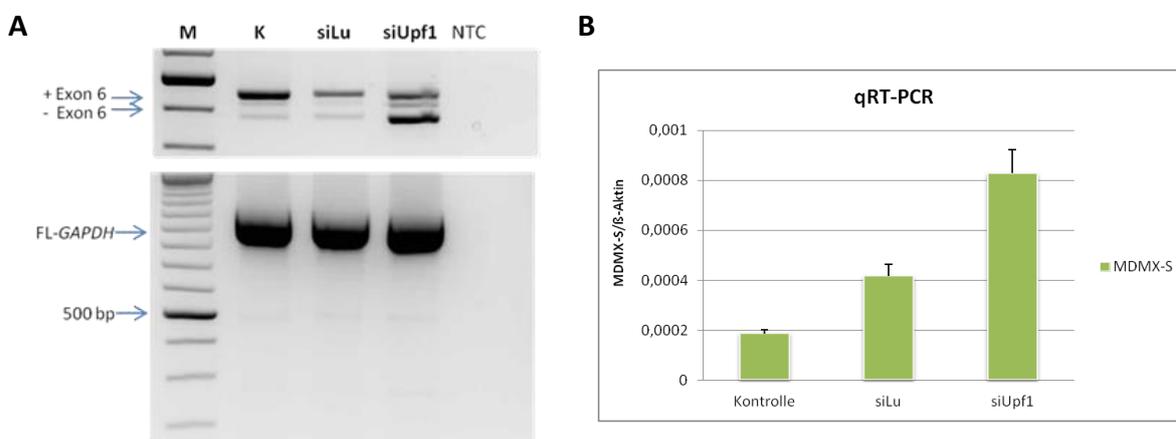


Abb. 4-16: Expression der MDMX-S-mRNA nach Upf1 Knockdown

A stellt die Expression von Transkripten mit und ohne Exon 6 nach Upf1 Knockdown dar. GAPDH dient als Beispiel für eine nicht gespleißte mRNA. In **B** ist die Expression von Transkripten ohne Exon 6 (MDMX-S-mRNA) mittels quantitativer Real-Time PCR ermittelt worden. β -Aktin diente zur Normierung der Werte. (M = 100 bp-Leiter, K = Kontrolle, siLu = siRNA gegen das Luciferasegen, NTC = negativ Kontrolle)

Nach Sicherstellung der erfolgreichen Hemmung des NMD durch Knockdown von Upf1 konnte die Expression der MDMX-S-mRNA überprüft werden. Der Upf1-Knockdown führt zur

Anhäufung von Transkripten ohne Exon 6 (Abb. 4-16 A und B). Das Verhältnis von Transkripten mit und ohne Exon 6 ist zugunsten der Deletion verschoben. Dies zeigt, dass durch die Inhibierung des NMD die Transkripte, denen das Exon 6 fehlt und somit die MDMX-S-mRNA bilden, verstärkt vorhanden sind. Die MDMX-S-mRNA kann nicht mehr abgebaut werden, da die Halbwertszeit dieser mRNA durch den Upf1-Knockdown verlängert wird. Schlussfolgernd ist die MDMX-S-mRNA in OAW-42 Zellen ein Substrat des NMD.

4.2 Untersuchungen zum alternativen Spleißvorgang des Exon 6 von MDMX

Mit den Untersuchungen zum NMD konnte gezeigt werden, dass die MDMX-S-mRNA ein NMD-Substrat ist und nicht in ein Protein translatiert wird. Durch diese Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es nach Behandlung der Tumorzelllinie OAW-42 mit Zytostatika (Cisplatin und Camptothecin) bevorzugt zum Herausspleißen des Exon 6 und damit zur Bildung der MDMX-S-mRNA kommt. Bekannt ist, dass das Verhältnis der MDMX-S-mRNA zum FL-MDMX-Transkript in einigen Tumorarten ein negativer prognostischer Marker ist [Bartel et al. 2005, Lenos et al. 2012]. Die klinische Relevanz der MDMX-S-mRNA besteht weiterhin, ist aber auf die mRNA-Ebene beschränkt, da diese ein Substrat des NMD ist. Aus diesen Gründen stellt der alternative Spleißprozess, der das Spleißen von Exon 6 reguliert, einen möglichen Therapieansatz dar, da so die Entstehung der MDMX-S-mRNA verhindert werden könnte.

4.2.1 Identifizierungen von Proteinen des alternativen Spleißprozesses von Exon 6 der MDMX-mRNA mittels RNA-Pull-Down

Im ersten Schritt wurde ein Fragment amplifiziert, das aus Exon 6 des humanen MDMX-Gens und den anliegenden Intronsequenzen besteht (Abb. 4-17 A). Aufgrund der Größe von Intron 5 (ca. 5000 nt) ist ein Vergleich zum Mausgenom vorgenommen worden, um konservierte Regionen zu identifizieren. Der Vergleich beider Sequenzen ergab eine hohe Übereinstimmung zwischen 75 nt *upstream* der Intron 5/Exon 6-Grenze bis 235 nt *downstream* der Exon 6/Intron 6-Grenze. Zur Amplifikation des Exon 6-Fragments (Ex6-V) wurden die Primer T7_Xi5_21608_fw und Xi6_22159_rev, sowie 20 ng DNA von OAW-42 Zellen eingesetzt. Der forward Primer enthielt eine Sequenz für den T7-Promotor, die für die

anschließende *in vitro* Transkription (ivT) benötigt wurde. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung im 1%igen Agarosegel konnte ein Fragment von 550 bp detektiert werden. Dieses wurde aus dem Gel gereinigt und die Konzentration bestimmt. Im Anschluss erfolgte die ivT nach Angaben des Herstellers (Megascript T7 *in vitro* transcription kit von Ambion) mit 150 ng des Exon 6-Fragments als Ausgangsmaterial.

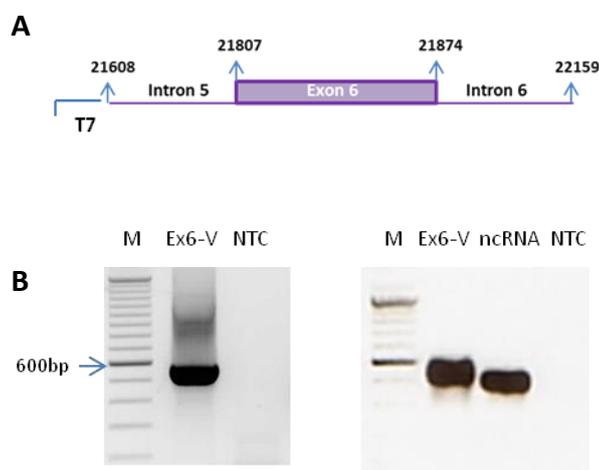


Abb. 4-17: Exon 6-Fragment

A zeigt die schematische Darstellung des Exon6-Fragments (Ex6-V) mit T7-Promotor-Sequenz (T7). Die Zahlen bestimmen die Start- und Schlusspositionen des amplifizierten Bereichs in der humanen genomischen Sequenz von MDMX. In **B** ist das amplifizierte Produkt (links) und das Exon6-Fragment nach erfolgter ivT (rechts) dargestellt. (M = 100 bp-Leiter, NTC = negativ Kontrolle, 21608 = 199 nt *upstream* der Intron 5/Exon 6-Grenze, 21807 = 1.Nukleotid im Exon 6, 21874 = letztes Nukleotid im Exon 6, 22159 = 285 nt *downstream* der Exon 6/Intron 6-Grenze)

Als Kontrolle der ivT und des nachfolgenden RNA-Pull-Downs wurde eine non-coding RNA (ncRNA) mitgeführt, die mit der MDMX-Sequenz nicht übereinstimmt, aber eine ähnliche Größe hat und ebenfalls im Kern lokalisiert ist (Abb. 4-17 B). Diese wurde durch die Gruppe von Dr. Sven Diederichs aus dem DKFZ in Heidelberg zur Verfügung gestellt. Es wurden je 45 µg *in vitro* transkribierte RNA und 2,7 mg Protein aus unbehandelten und mit Cisplatin behandelten OAW-42 Zellen für den RNA-Pull-Down eingesetzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 4°C mittels 10%igen Trenngel für 1 h bei 150 V und abschließend 5 h bei 200 V. Danach ist das Gel mittels Silbernitratlösung angefärbt worden (Abb. 4-18). Nach Auswahl geeigneter Banden wurden diese ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. Das vollständige Gelbild der Silberfärbung, sowie die komplette Proteinliste der massenspektrometrischen Auswertung, sind im Anhang zu finden.

Zwischen 60 und 70 kDa sind in der Probe, die das Exon 6-Fragment beinhaltet und mit Protein aus unbehandelten Zellen inkubierte, stark ausgebleichte Banden detektierbar (Abb.

4-18, Spur 2). Dies kann daraufhin deuten, dass eine Anhäufung einzelner Proteine vorhanden sein könnte. Diese Banden (orange umrandet in Abb. 4-18) wurden massenspektrometrisch untersucht. Das Herausspleißen von Exon 6 der MDMX-mRNA erfolgt in OAW-42 Zellen auch ohne Behandlung mit Zytostatika. Daher ist es möglich, dass sich hinter einer dieser Banden ein Protein verbirgt, das unter physiologischen Bedingungen am Spleißen dieses Exons beteiligt ist. Als Vergleich ist die ncRNA-Probe mit Protein aus unbehandelten OAW-42 Zellen ebenfalls mit untersucht worden. In der Probe, die mit Proteinlysate aus Cisplatin behandelten Zellen versetzt wurde, kann auf gleicher Höhe keine Bande detektiert werden. Dies lässt vermuten, dass nach Cisplatin Behandlung andere Proteine rekrutiert werden.

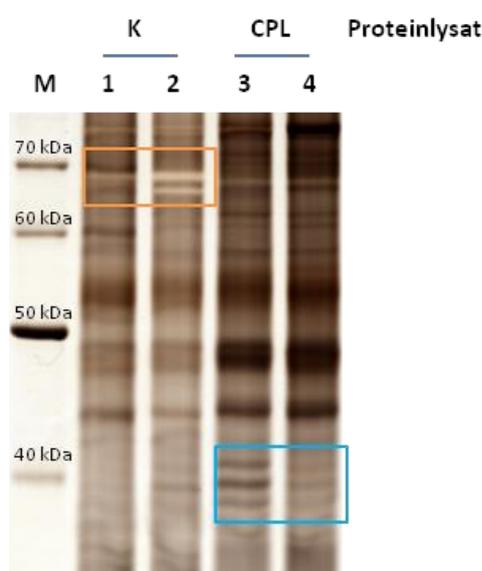


Abb. 4-18 Ausschnitt des SDS-Gels nach Färbung mit Silbernitrat

Dargestellt ist ein Ausschnitt des SDS-Gels nach RNA-Pull-Down des Exon6-Fragments mit Proteinlysate aus unbehandelten (2) und Cisplatin behandelten OAW-42 Zellen (3). Als Kontroll-RNA wurde eine ncRNA identisch behandelt und zum Vergleich immer mitgeführt (1 und 4). Die orange bzw. blau umrandeten Areale wurden zur Analyse ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. (M = Proteinstandard, K = Proteinlysate aus unbehandelten OAW-42 Zellen, CPL = Proteinlysate aus Cisplatin behandelten OAW-42 Zellen)

Bei ca. 40 kDa zeigte sich in der Probe, die das Exon 6-Fragment enthielt und mit Protein aus Cisplatin behandelten Zellen stammte, eine Konstellation aus drei Banden unterschiedlicher Stärke (Abb. 4-18, Spur 3). Diese waren schwach auch in der Vergleichsprobe (Spur 4) zu sehen. Hier könnte es sich um Proteine handeln, die bevorzugt nach Cisplatin Behandlung aktiviert werden und somit auch potentielle Kandidaten für das bevorzugte Spleißen von Exon 6 nach solch einer Therapie sind. Diese wären zwar nicht sequenzspezifisch für die

MDMX-mRNA, aber die verstärkte Expression bestimmter Spleißfaktoren könnte ebenfalls den Ein- bzw. Ausschluss von Exon 6 beeinflussen.

Die massenspektrometrische Auswertung ergab eine Vielzahl an potentiellen Proteinen. Als Auswahlkriterien dienten das Molekulargewicht, ein hoher Score, sowie eine möglichst starke Übereinstimmung (matches und coverage). Drei Proteine entsprachen den genannten Kriterien (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: potentielle Bindeproteine des Exon 6-Fragments

Exon 6 - Variante	Proteinname	score	Mass in kDa	matches	Coverage [%]
Kontrolle	PUF60	606	60	43	33,8
Cisplatin	hnRNP-C2	799	33	116	41,9
	hnRNP-E1	319	38	21	26,1

PUF60 ist ein Pyrimidin-Trakt-bindendes Protein, welches den alternativen Spleißprozess beeinflussen kann [Hastings et al. 2007]. Dieses Spleißprotein konnte in der Probe identifiziert werden, die das Exon 6-Fragment enthielt und mit Proteinlysate aus unbehandelten OAW-42 Zellen inkubierte. hnRNP-C2 und -E1 sind RNA-bindende Proteine und wichtige regulatorische Proteine bei der Zellantwort nach einem DNA-Schaden [Haley et al. 2009]. Beide Proteine sind aus der Probe ermittelt worden, die das Exon 6-Fragment enthielt und mit Proteinlysate aus Cisplatin behandelten Zellen inkubierte.

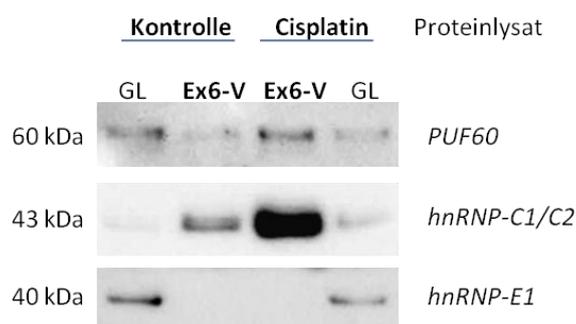


Abb. 4-19: Western-Blot Analyse der nach dem RNA-Pull-Down ermittelten Spleißproteine

Dargestellt sind die Spleißproteine PUF60, hnRNP-C1/C2 und -E1. Es wurde für jede Probe je 1 µl Protein eingesetzt. Das Protein stammte aus der Präzipitation des RNA-Pull-Down. Die Proben „Ex6-V“ enthalten das Exon 6-Fragment mit gebundenem Protein, welches aus unbehandelten bzw. Cisplatin behandelten OAW-42 Zellen stammte. Das Gesamtproteinlysate (GL) stammte ebenfalls aus OAW-42 Zellen und wurde 1:10 verdünnt verwendet.

Zur Überprüfung der Bindung dieser drei Proteine an das Exon 6-Fragment wurde ein Proteinnachweis mittels Western-Blot durchgeführt. Alle drei Proteine sind im Gesamtproteinlysate (GL), welches aus OAW-42 Zellen isoliert wurde und als Proteinlysate für den RNA-Pull-Down diente, detektierbar (Abb. 4-19). PUF60 und hnRNP-C1/2 sind zusätzlich in den Proben, die das Exon 6-Fragment enthalten nachweisbar. Somit ist die Bindung dieser beiden Spleißproteine an das Exon 6-Fragment (Ex6-V) erwiesen. hnRNP-C2 (44 kDa) ist eine Spleißvariante von hnRNP-C1 (41 kDa) und kann auf Grund deren Molekulargewichte nur im Komplex mit hnRNP-C1 detektiert werden. Ein Nachweis für die Bindung von hnRNP-E1 an das Exon 6-Fragment konnte nicht erbracht werden. Somit ist hnRNP-E1 als Bindeprotein dieses MDMX-Bereiches ausgeschlossen.

4.2.2 Einfluss der Spleißfaktoren PUF60 und hnRNP-C beim Spleißen der MDMX-mRNA

Im Anschluss ist der Einfluss der Proteine PUF60 und hnRNP-C1/2 (hnRNP-C) auf das Spleißen der MDMX-mRNA untersucht worden. Hierfür wurden diese Proteine in zwei verschiedenen Ovarialkarzinomzelllinien (OAW-42, SKOV-3) mittels siRNAs herunterreguliert. Die verwendeten Zelllinien wurden auf Grund des unterschiedlichen p53-Status (wt, null) und der verschiedenen Grundexpression der MDMX-S-mRNA, zur Untersuchung herangezogen.

PUF60 konnte in beiden Zelllinien zu 90 % herunterreguliert werden (Abb. 4-20 A). Der Knockdown (KD) von PUF60 führt in der p53-wt Zelllinie OAW-42 zur Reduktion des MDMX-Proteinlevels. Die Expression der Referenzproteine Vinculin bzw. β -Aktin blieb unverändert. Auf mRNA-Ebene ist ebenfalls eine Verringerung der Gesamttranskriptmenge der MDMX-mRNA von über 50 % zu detektieren (Abb. 4-20 B). Darüber hinaus kommt es zur veränderten Expression von Transkripten mit und ohne Exon 6. Nach KD von PUF60 tritt verstärktes Exon 6 Skipping auf (Abb. 4-21 A und B). Dies lässt vermuten, dass PUF60 in OAW-42 Zellen einen Einfluss auf das Spleißen der MDMX-mRNA hat. Darüber hinaus deutet die Reduktion der mRNA-Gesamttranskriptmenge auf eine Veränderung der Transkriptionseffizienz hin. Die verminderte Transkription von MDMX und die verstärkte Bildung von Transkripten ohne Exon 6 nach PUF60-KD bieten eine Erklärung für den geringen MDMX-Proteinlevel.

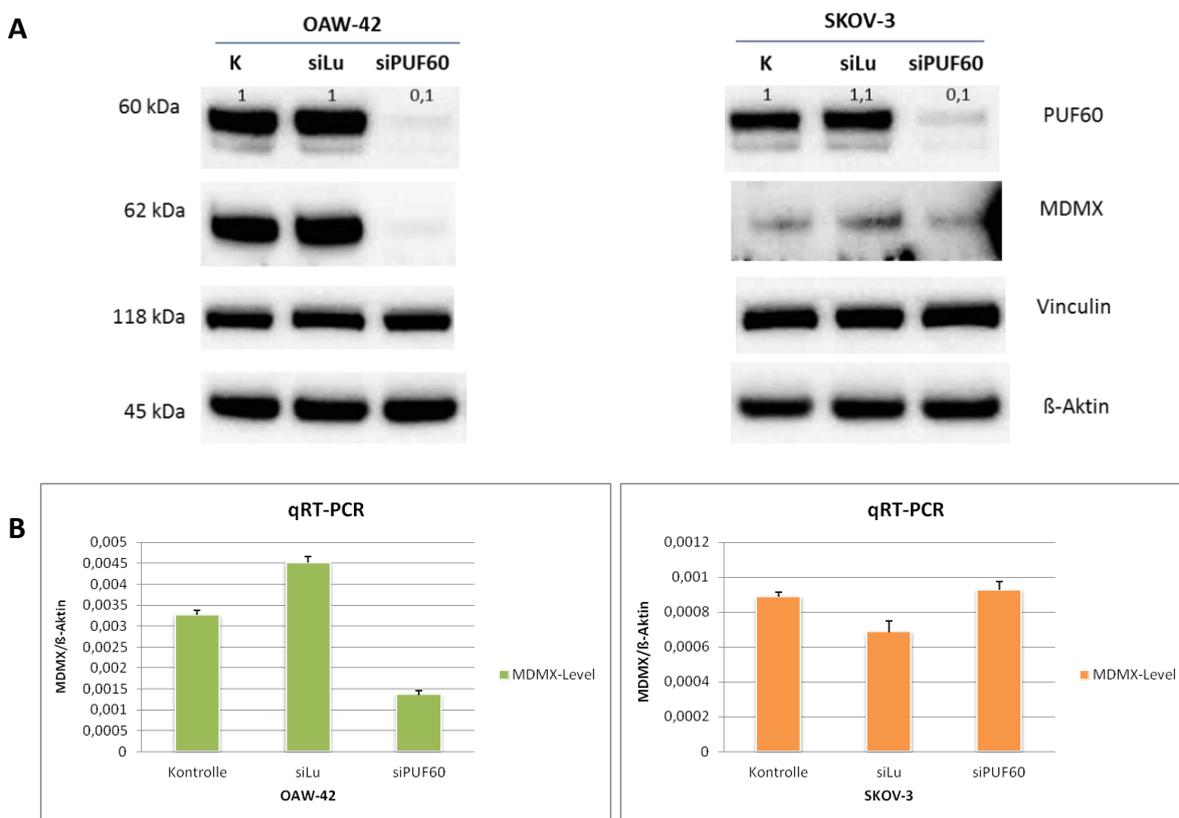


Abb. 4-20: Transfektion von OAW-42 und SKOV-3 Zellen mit siRNA gegen PUF60

A Die Expression der Proteine PUF60 und MDMX sind nach Transfektion mit 100 nM siRNA gegen PUF60 für 72 h im Western-Blot überprüft worden. Es wurden 15 µg Gesamtproteinlysate eingesetzt. Vinculin und β-Aktin dienten als Ladekontrolle. Die Zahlenwerte wurden mittels der Bio1D-Software ermittelt und stellen das Volumen der Bandenstärke von PUF60 dar. In **B** ist die Gesamttranskriptmenge der MDMX-mRNA mittels quantitativer Real-Time PCR analysiert worden. Die Expression der β-Aktin-mRNA diente als Normierungsgrundlage. Die Gesamttranskriptmenge ist im Verhältnis zur β-Aktin-mRNA dargestellt. (K = unbehandelte Kontrolle, siLu = siRNA gegen das Luciferasegen)

In SKOV-3 Zellen (p53-null) hat der KD von PUF60 weder Einfluss auf das MDMX-Proteinlevel, noch auf das mRNA-Level (Abb. 4-20 A und B). Transkripte ohne Exon 6 sind nach PUF60-KD, im Vergleich zu Transkripten mit Exon 6, unverändert stark exprimiert (Abb. 4-21 A und B). SKOV-3 Zellen exprimieren unter physiologischen Bedingungen bereits viele Transkripte mit deletiertem Exon 6 und kaum das FL-MDMX-Transkript. Hingegen zeigen OAW-42 Zellen (wt-p53) unter physiologischen Bedingungen eine verstärkte Expression von Transkripten mit Exon 6 im Vergleich zu Transkripten ohne Exon 6. Diese Unterschiede könnten bedingt sein durch den unterschiedlichen p53-Status. Daher könnte der Einfluss von PUF60 auf das Spleißen der MDMX-mRNA möglicherweise beschränkt auf p53-wt Zellen sein.

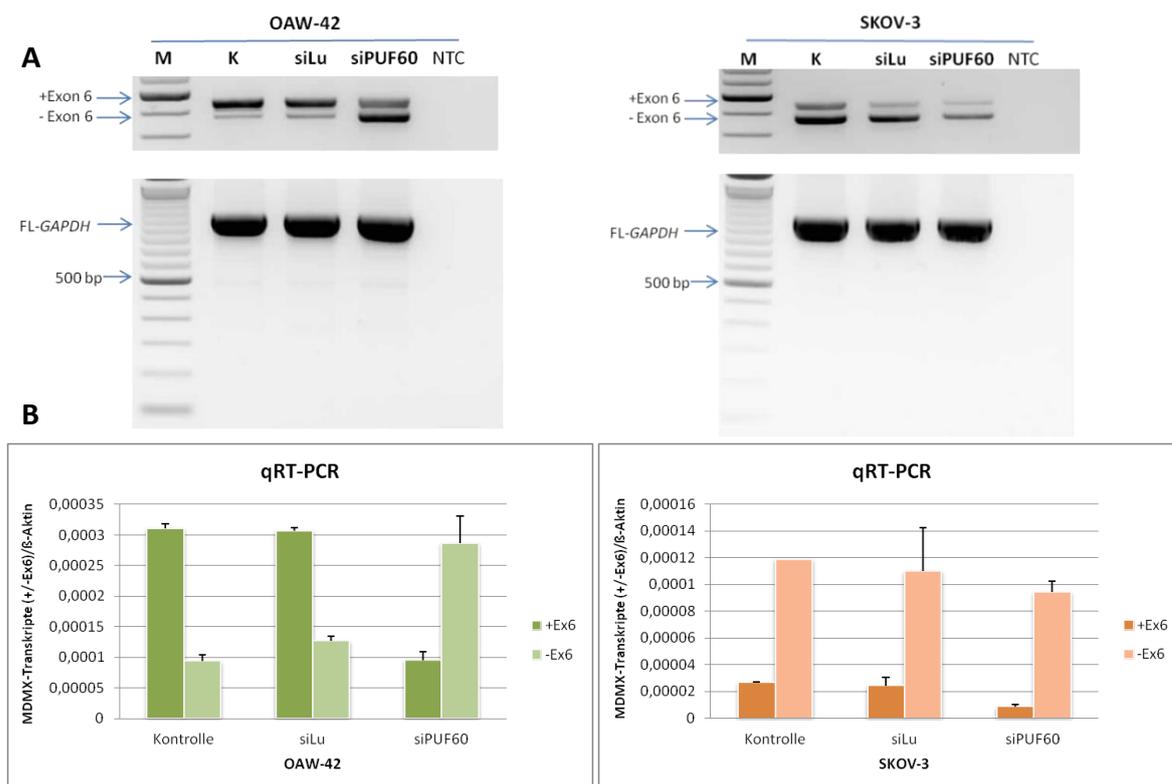


Abb. 4-21: Expression von MDMX nach Transfektion mit siRNA gegen PUF60

In **A** ist die Amplifikation von Exon 6 in OAW-42 und SKOV-3 Zellen mit den Primern Ex3_4fw und Ex8_9rev im Agarosegel dargestellt. Die Expression des GAPDH (FL-GAPDH) dient als Beispiel für eine nicht alternativ gespleißte mRNA. **B** stellt mittels quantitativer Real-Time PCR das Verhältnis von Transkripten mit und ohne Exon 6 nach KD von PUF60 dar. Es wurden die Kopien pro μl gemessen und mit den erhaltenen Kopien des Housekeepinggens β -Aktin zur Normierung ins Verhältnis gesetzt. (M = 100 bp-Leiter, NTC = negativ Kontrolle, K = unbehandelte Kontrolle, siLu = siRNA gegen das Luciferasegen)

Der zweite im Pull-Down detektierte Spleißfaktor hnRNP-C konnte in OAW-42 Zellen zu 80 % und in SKOV-3 Zellen bis zu 60 % herunterreguliert werden. In OAW-42 Zellen zeigt sich nach Inhibierung der hnRNP-C-mRNA eine leichte Reduktion des mRNA-Levels. Der MDMX-Proteinlevel sinkt um ca. 50 % (Abb. 4-22 A und B). Die verringerte Expression des MDMX-Proteins lässt sich somit durch die verminderte Transkriptionsrate der MDMX-mRNA erklären. Darüber hinaus hat hnRNP-C ebenfalls einen Einfluss auf das Spleißen der MDMX-mRNA. Nach KD von hnRNP-C kommt es zum verstärkten Exon 6 Skipping. Die Expression von Transkripten mit Exon 6 bleibt aber nahezu gleich. Im Unterschied zum KD von PUF60 sind nach Herunterregulation von hnRNP-C die Transkripte mit und ohne Exon 6 annähernd gleich stark exprimiert (Abb. 4-23 A und B).

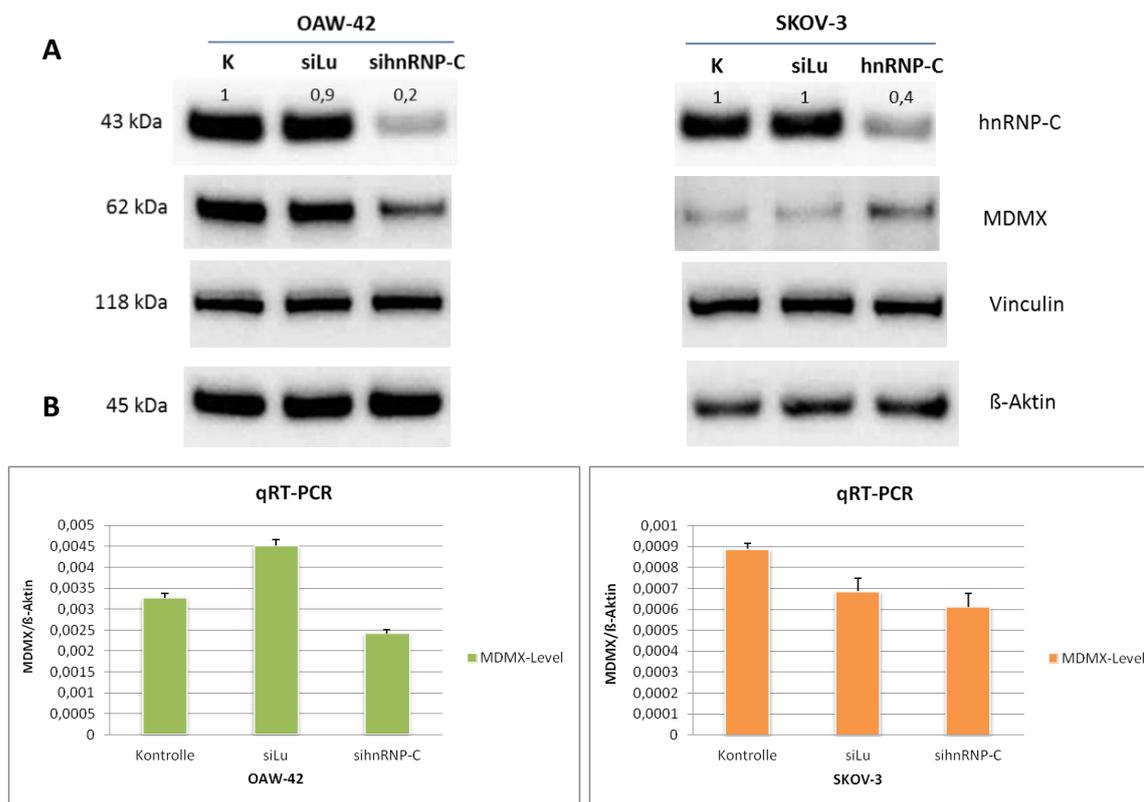


Abb. 4-22: Transfektion von OAW-42 und SKOV-3 Zellen mit siRNA gegen hnRNP-C

A Die Expression der Proteine hnRNP-C und MDMX sind nach Transfektion mit 100 nM siRNA gegen PUF60 für 72 h im Western-Blot überprüft worden. Es wurden 15 µg Gesamtproteinlysate eingesetzt. Vinculin und β-Aktin dienten als Ladekontrolle. Die Zahlenwerte wurden mittels der Bio1D-Software ermittelt und stellen das Volumen der Bandenstärke von hnRNP-C dar. In **B** ist die Gesamttranskriptmenge der MDMX-mRNA mittels quantitativer Real-Time PCR analysiert worden. Die Expression der β-Aktin-mRNA diente als Normierungsgrundlage. Die Gesamttranskriptmenge ist im Verhältnis zur β-Aktin-mRNA dargestellt. (K = unbehandelte Kontrolle, siLu = siRNA gegen das Luciferasegen)

In SKOV-3 Zellen führt die Herunterregulation von hnRNP-C zum Anstieg des MDMX-Proteinlevels, bei gleichbleibendem MDMX-mRNA-Level (Abb. 4-22 A). Die Transkriptionseffizienz ist daher nicht durch hnRNP-C beeinflusst. Interessant ist hingegen die erhöhte Expression des MDMX-Proteins. SKOV-3 Zellen exprimieren unter physiologischen Bedingungen wenig FL-MDMX. Die MDMX-S-mRNA ist hingegen stark vorhanden. Auch nach KD von hnRNP-C ändert sich an diesem Expressionsniveau nichts. Es sind weiterhin deutlich weniger Transkripte mit Exon 6, als ohne Exon 6 vorhanden (Abb. 4-23 A und B). Die erhöhte Expression des MDMX-Proteins nach hnRNP-C KD ist daher nicht mit einer veränderten Spleißaktivität zu erklären.

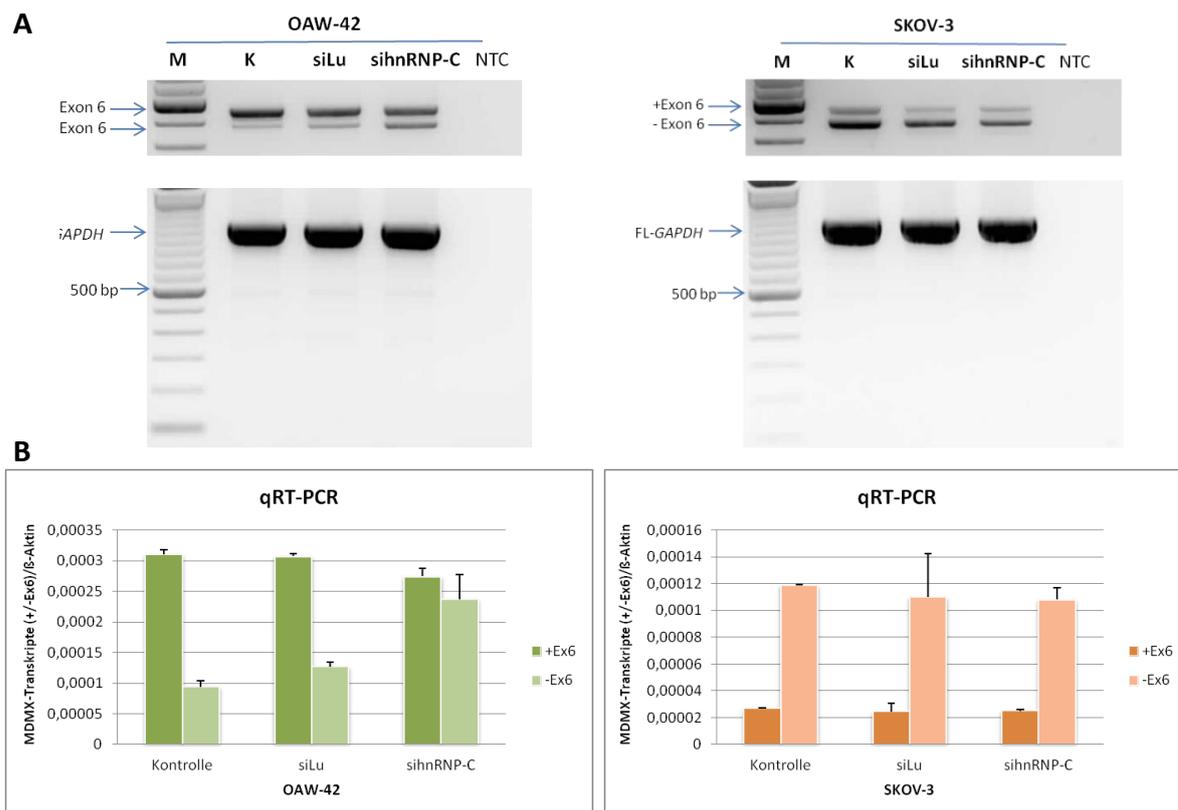


Abb. 4-23: Expression von MDMX nach Transfektion mit siRNA gegen hnRNP-C

In **A** ist die Amplifikation von Exon 6 in OAW-42 und SKOV-3 Zellen mit den Primern Ex3_4fw und Ex8_9rev im Agarosegel dargestellt. Die Expression des GAPDH (FL-GAPDH) dient als Beispiel für eine nicht alternativ gespleißte mRNA. **B** stellt mittels quantitativer Real-Time PCR das Verhältnis von Transkripten mit und ohne Exon 6 nach KD von hnRNP-C dar. Es wurden die Kopien pro μ l gemessen und mit den erhaltenen Kopien des Housekeepinggens β -Aktin zur Normierung ins Verhältnis gesetzt. (M = 100 bp-Leiter, NTC = negativ Kontrolle, K = unbehandelte Kontrolle, siLu = siRNA gegen das Luciferasegen)

Im Vergleich der beiden Zelllinien führte der KD von PUF60 bzw. hnRNP-C in der wt-p53 Zelllinie OAW-42 zur Reduktion von MDMX und zum Exon 6 Skipping. Dagegen zeigte die p53-null Zelllinie SKOV-3 nach KD von PUF60 keine veränderte Expression von MDMX. Der KD von hnRNP-C führte hingegen zum Anstieg des MDMX-Proteinlevels. Beide Spleißproteine, die durch den RNA-Pull-Down bestimmt und als Bindeproteine der MDMX-mRNA nachgewiesen worden, haben somit in wt-p53 Zellen nachweislich einen Einfluss auf das Herausspleißen von Exon 6 der MDMX-mRNA.

4.2.3 Expression von PUF60 und hnRNP-C nach Stessinduktion

Im Anschluss sollte untersucht werden, ob DNA-Schäden einen Einfluss auf die Expression der beiden Spleißproteine haben. Hierfür wurden die Zellen mit 20 μ M Cisplatin für 6 und

18 h, sowie mit 8 μ M Camptothecin für 6 und 24 h behandelt. Wie unter 4.1 beschrieben, entstehen sowohl nach einer Behandlung mit Cisplatin, als auch mit Camptothecin, primär alternativ gespleißte Transkripte. Spleißproteine, die am alternativen Spleißprozess beteiligt sind, gehören zur hnRNP-Familie. hnRNP-C ist ein Vertreter dieser Gruppe. PUF60 hingegen ist als Pyrimidin-Trakt-Bindeprotein essentieller Bestandteil des Spleißosoms und darüber hinaus für die Erkennung der 3`Spleißstelle mit verantwortlich [Hastings et al. 2007].

Beide Spleißproteine können in OAW-42 Zellen detektiert werden. Die Behandlung mit den beiden Zytostatika Cisplatin und Camptothecin führt in OAW-42 Zellen zur verstärkten Expression von hnRNP-C (Abb. 4-24). Nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit Camptothecin ist das Protein 1,7-fach stärker exprimiert im Vergleich zu den Kontrollen. Die mit Cisplatin behandelten Zellen zeigen nach 18 h Behandlungsdauer eine Erhöhung der Expression auf das 1,5-fache im Vergleich zur Kontrolle.

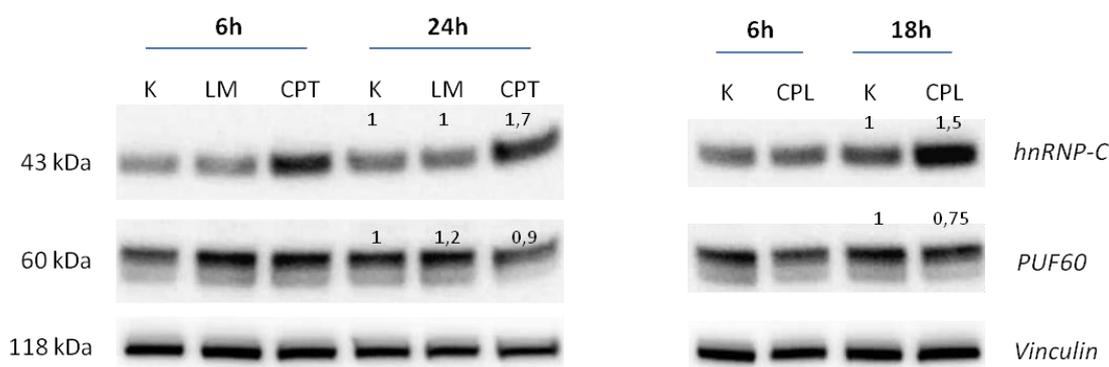


Abb. 4-24: Expression der Spleißproteine hnRNP-C und PUF60 nach Behandlung mit Zytostatika

Die Expression von hnRNP-C und PUF60 sind nach Behandlung mit Camptothecin (CPT) für 6 h und 24 h, sowie mit Cisplatin (CPL) für 6 h und 18 h dargestellt. Es wurden 15 μ g Protein zur Analyse eingesetzt. Vinculin diente als Ladekontrolle und zur Normierung der Berechnung der Bandenstärken. Die Bandenstärke wurde mit der Bio1D-Software bestimmt. (K = Kontrolle, LM = Lösungsmittelkontrolle-Chlorophorm/Methanol)

PUF60 wird hingegen nach 24-stündiger Camptothecin bzw. 18-stündiger Cisplatin Behandlung leicht vermindert exprimiert (Abb. 4-24). Die Behandlung mit den Zytostatika führt, wie unter 4.1 beschrieben, zum verstärkten Exon 6 Skipping. Der KD von PUF60 löste ebenfalls erhöhtes Exon 6 Skipping aus (Abb. 4-21). Durch diese drei Ergebnisse wird ein Zusammenhang zwischen Stressinduktion (DNA-Schaden) und dem alternativem Spleißen deutlich.

4.3 Bedeutung von Proteinen des DNA-Damage-Pathways beim Spleißen der MDMX-mRNA

ATM und ATR sind Proteine, die zur Familie der Serin/Threonin Kinasen gehören. Nach DNA-Schäden fungieren diese in der Signalkaskade des Zellzyklus. ATM aktiviert nach DNA-Doppelstrangbrüchen, z.B. ausgelöst durch ionisierende Strahlung (IR) oder Cisplatin, G₁/S-, S- und G₂/M-Phase Arrest. Dagegen kommt es nach DNA-Einzelstrangbrüchen, u.a. bei Defekten der DNA-Replikation (z.B. durch Camptothecin) zum ATR vermittelten S- und G₂/M-Phase Arrest [Abraham et al. 2001]. Über die Aktivierung der Checkpoint Kinasen ChK1 und ChK2 kann nach DNA-Schaden u.a. der Transkriptionsfaktor p53 phosphoryliert und aktiviert werden. Katzenberger et al. (2006) konnten zeigen, dass sowohl ATM, als auch ATR, am alternativen Spleißen einzelner Exone der TAF1-mRNA beteiligt sind. Nach Stressinduktion konnte die Expression von zwei alternativ gespleißten Transkriptvarianten der TAF1-mRNA detektiert werden. Durch Inhibierung des ATM/ATR-Pathways mittels Koffein wurde die Expression dieser Transkriptvarianten gehemmt. In Bezug auf die MDMX-mRNA kommt es nach Stressinduktion ebenso zum alternativen Spleißen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass ATM und ATR auch einen Einfluss auf das Spleißen der MDMX-mRNA haben und eventuell speziell das Exon 6 Skipping regulieren.

4.3.1 Einfluss der Kinasen ATM und ATR im alternativen Spleißprozess der MDMX-mRNA

Im Folgenden sollte der Einfluss von ATM und ATR auf das alternative Spleißen der MDMX-mRNA nach DNA-Schaden ermittelt werden. Die Signalkaskaden, die nach DNA-Schäden u.a. von ATM und ATR aktiviert werden, können mittels Inhibitoren gehemmt werden. Eine dieser Substanzen ist CGK733, welche beide Kinasen inhibieren kann [Bhattacharya et al. 2009]. Geringe Dosen von CGK733 bewirken die Aktivierung der Apoptose, die auf Grund der Hemmung der DNA-Reparatur entsteht. Bei hohen Dosen hingegen führt die Inhibierung der Transkription zum Zelltod [Goldstein et al. 2008].

Zur Bestimmung einer geeigneten Konzentration wurde ein WST-Test durchgeführt. In OAW-42 Zellen lag der LD₅₀-Wert nach 24 h Inkubation mit CGK733 bei 15 µM und nach 48 h bei 7 µM (Abb. 4-26). Die nachfolgenden Versuche wurden mit 10 µM CGK733 für einen Behandlungszeitraum von 24 bis 42 Stunden durchgeführt. OAW-42 Zellen wurden mit

10 μM des ATM/ATR-Inhibitors CGK733 24 h vorinkubiert und anschließend für 18 h mit 20 μM Cisplatin behandelt. Es wurden für die gesamte Behandlungsdauer von 42 Stunden Zellen mitgeführt, die ausschließlich mit dem Inhibitor inkubierten.

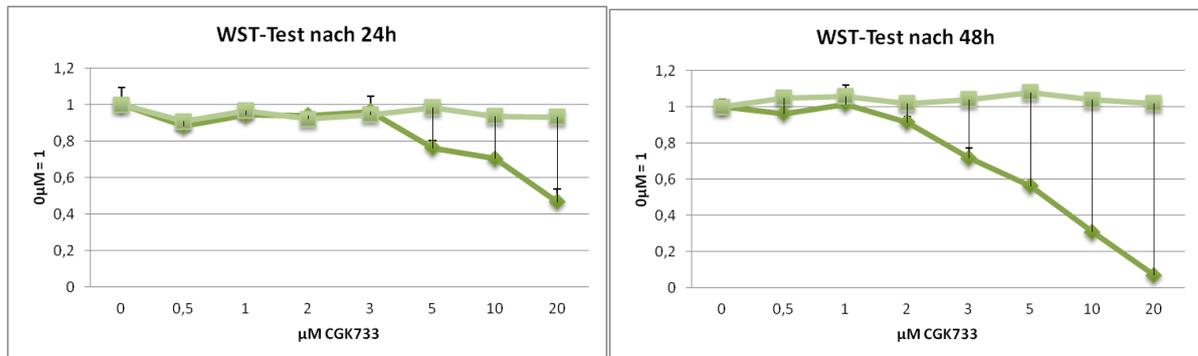


Abb. 4-26: Ermittlung des LD₅₀-Wertes des ATM/ATR-Inhibitor CGK733 mittels WST-1-Reagenz

Dargestellt sind die Extinktionen bei 434 nm nach 24 und 48 Stunden Behandlung mit dem Inhibitor (dunkelgrün) und dessen Lösungsmittel DMSO (hellgrün). Das Lösungsmittel wurde im gleichen Volumen eingesetzt, welches benötigt wurde um die entsprechende Inhibitor-Konzentration zu erhalten.

Um die Effektivität des Inhibitors zu überprüfen, wurden Proteine der nachfolgenden Signalkaskade des ATM/ATR-Pathways untersucht. Dazu gehört u.a. das Checkpoint-Kinase Protein Chk1. Chk1 wird am Serin 345 durch ATR nach DNA-Schäden phosphoryliert [Hurley und Bunz, 2007]. Die Behandlung mit Cisplatin führt sowohl nach 6 h als auch nach 18 h zur Aktivierung von Chk1 am Serin 345 (Abb. 4-27). Eine Vorinkubation mit CGK733 und anschließender Behandlung mit Cisplatin für 18 h führt nicht zur Phosphorylierung am Serin 345 von Chk1. Dies zeigt eine effektive Inhibierung des ATR-Pathways. Noch deutlicher ist die Hemmung des ATM/ATR-Pathways durch den Inhibitor CGK733 am Serin 15 von p53 zu erkennen. Beide Kinasen können p53 am Serin 15 über Chk1 bzw. Chk2 phosphorylieren. Die alleinige Behandlung von OAW-42 Zellen mit Cisplatin bewirkt eine starke Phosphorylierung von p53 am Serin 15. Die Vor-inkubation der Zellen mit CGK733 verhindert diese Phosphorylierung. Nach DNA-Schäden kommt es über p53 zur verstärkten Expression von p21, einem Zellzyklusarrest einleitenden Proteins. p21 ist daher nach Cisplatin Behandlung verstärkt exprimiert. Durch Hemmung des ATM/ATR-Pathways mit dem Inhibitor und anschließender Cisplatin Behandlung ist die Expression von p21 ebenfalls stark vermindert. Somit kann gezeigt werden, dass der Inhibitor die Signalkaskade von ATM und ATR nach einem DNA-Schaden effektiv hemmt.

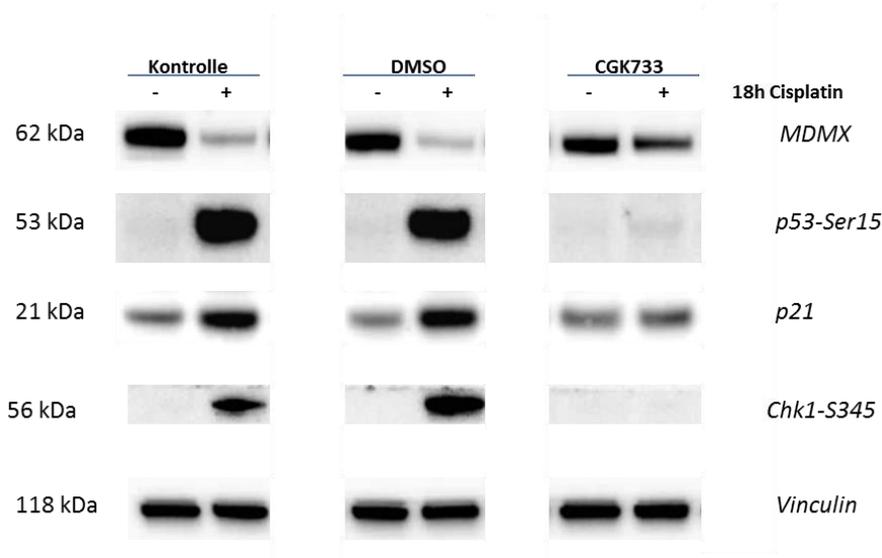


Abb. 4-27: Expression von MDMX und Proteinen der nachfolgenden Signalkaskade des ATM/ATR-Pathways nach Inkubation von OAW-42 Zellen mit dem ATM/ATR-Inhibitor CGK733

Dargestellt ist die Proteinexpression von MDMX, p53-Ser15, p21 und Chk1-S345. Vinculin diente als Ladekontrolle. Es wurden 15 µg Gesamtproteinlysate der OAW-42 Zellen zur Analyse verwendet.

Eine Behandlung von OAW-42 Zellen mit Cisplatin führt zur Reduktion des MDMX-Proteinlevels. Die Inhibierung des ATM/ATR-Pathways verhindert den vollständigen Abbau von MDMX nach Behandlung mit Cisplatin (Abb. 4-27). Folglich ist ATM nicht mehr in der Lage MDMX am Serin 403 zu phosphorylieren. Diese Phosphorylierungsstelle ist für den MDM2-vermittelten proteasomalen Abbau von MDMX nach einem DNA-Schaden essenziell [Chen et al. 2005]. Darüber hinaus ist eine Veränderung bei der Transkription von MDMX ebenfalls denkbar. Daher sollte der Einfluss von ATM und ATR auf das Spleißen der MDMX-mRNA untersucht werden. Die Behandlung von OAW-42 Zellen mit Cisplatin führt, wie unter 4.1.2 beschrieben, verstärkt zum Exon 6 Skipping. Im Folgenden wird untersucht, ob durch Inhibierung des ATM/ATR-Pathways, das nach Schädigung der DNA verstärkt auftretende alternative Spleißen der Exone 4 bzw. 6, beeinflusst wird.

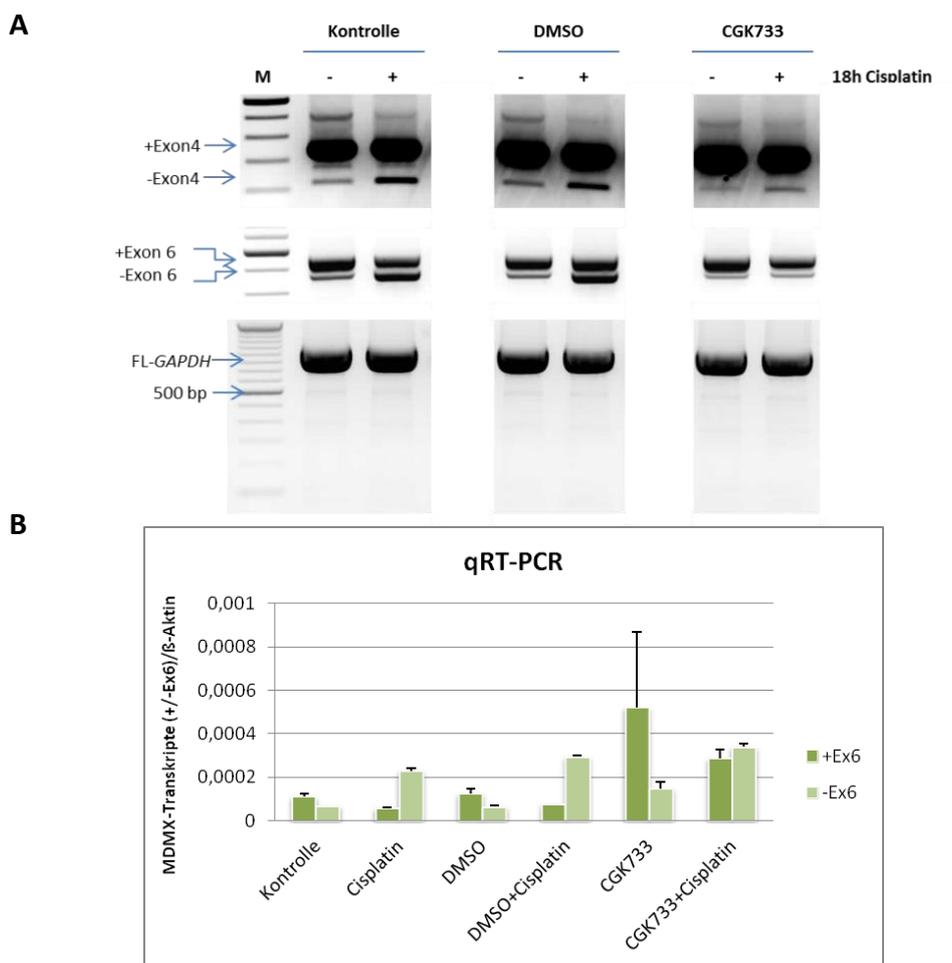


Abb. 4-28: Expression der MDMX-mRNA nach Inkubation von OAW-42 Zellen mit CGK733

In **A** ist die Amplifikation von Exon 4 bzw. 6 mit den Primern MDMX-139 und X487rev bzw. Ex3_4fw und Ex8_9rev im Agarosegel dargestellt. Die Expression des GAPDH (FL-GAPDH) dient als Beispiel für eine nicht alternativ gespleißte mRNA. **B** stellt mittels quantitativer Real-Time PCR das Verhältnis von Transkripten mit und ohne Exon 6 dar. Es wurden die Kopien pro μl gemessen und mit den erhaltenen Kopien des Housekeepinggens β -Actin zur Normierung ins Verhältnis gesetzt. (M = 100 bp-Leiter)

Es konnte gezeigt werden, dass es durch Hemmung des ATM/ATR-Pathways mit dem Inhibitor CGK733 zu einem verminderten Exon Skipping beider Exone kommt. Nach Vorinkubation mit dem Inhibitor und anschließender Behandlung der Zellen mit Cisplatin sind Transkripte ohne Exon 4 bzw. 6 deutlich vermindert exprimiert im Vergleich zu den Cisplatin Kontrollen (Abb. 4-28 A). Diese klar erkennbare Reduktion von Transkripten ohne Exon 6 nach Hemmung des ATM/ATR-Pathways kann durch die quantitative Analyse nicht gezeigt werden (Abb. 4-28 B). Nach Behandlung der Zellen mit Cisplatin steigt die Expression von Transkripten ohne Exon 6 an. Die Vorinkubation mit dem Inhibitor und anschließender Behandlung der Zellen mit Cisplatin ergibt eine annähernd gleich starke Expression von Transkripten mit und ohne Exon 6. Hinzu kommt, dass die Expression der Transkripte mit

Exon 6 nach Hemmung des ATM/ATR-Pathways, im Vergleich zu den Kontrollen, ansteigt (Abb. 4-28 B). Durch die veränderte Expression der Transkripte mit und ohne Exon 6 bzw. Exon 4 nach Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor, zeigt sich der Einfluss des ATM/ATR-Pathways auf das Spleißen der MDMX-mRNA.

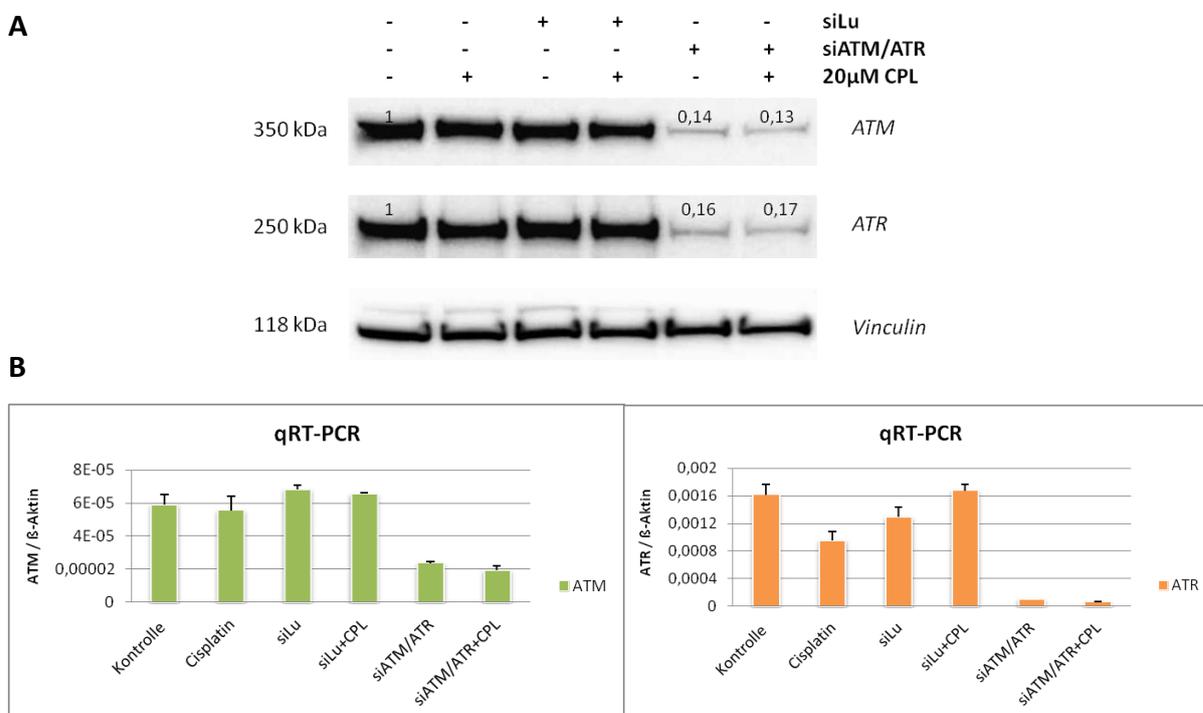


Abb. 4-29: Expression von ATM und ATR nach Transfektion mit siRNAs

A stellt die Expression von ATM und im Western-Blot dar. Es wurden 15 µg Gesamtproteinlysate zur Analyse eingesetzt. Vinculin diente als Ladekontrolle und zur Normierung der Berechnung der Bandenstärken. Die Bandenstärke wurde mit der Bio1D-Software bestimmt. **B** zeigt die quantitative Analyse der ATM- und ATR-mRNA. Zur Normierung der Messwerte diente β -Aktin. (siLu = siRNA gegen das Luciferasegen, CPL = Cisplatin)

Eine weitere Möglichkeit zur Inhibierung des ATM/ATR-Pathways ist der gezielte Knockdown dieser Proteine mittels siRNAs. Mit Hilfe dieser Methode sollten die oben genannten Ergebnisse bestätigt werden. Daher wurden OAW-42 Zellen für 72 h mit je 20 nM siRNA gegen ATM und ATR transfiziert und 18 h mit Cisplatin behandelt.

ATM und ATR konnten auf Proteinebene um mehr als 80 % herunterreguliert werden (Abb. 4-29 A). Auf mRNA-Ebene ist ein Knockdown von mehr als 60 % für ATM und über 90 % für ATR erzielt worden (Abb. 4-29 B). Die Expression der nach DNA-Schaden aktivierten Proteine wurden ebenfalls überprüft. Die Behandlung der Zellen zeigt erwartungsgemäß eine starke Phosphorylierung am Serin 15 von p53 und am Serin 345 von Chk1, sowie eine verstärkte Expression von p21 (Abb. 4-30). Der MDMX-Proteinlevel ist nach Cisplatin Behandlung vermindert. Der Knockdown von ATM und ATR mittels siRNAs und die damit verbundene

Hemmung des ATM/ATR-Pathways führt nach Stressinduktion zur verminderten Phosphorylierung von p53 am Serin 15 und von Chk1 am Serin 345. Auch die Expression von p21 ist verringert. Hingegen wird MDMX im Vergleich zur Cisplatin Kontrolle stärker exprimiert. Diese Resultate konnten ebenfalls durch den Inhibitor CGK733 erzielt werden und bilden daher die Grundlage zur Analyse des Spleißens der MDMX-mRNA.

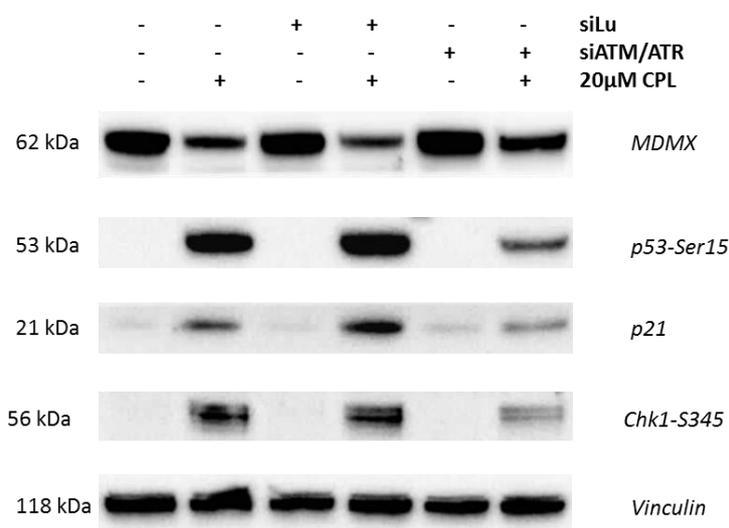


Abb. 4-30: Expression von MDMX und Proteinen der nachfolgenden Signalkaskade des ATM/ATR-Pathways nach Knockdown von ATM und ATR mit siRNA

Dargestellt ist die Proteinexpression von MDMX, p53-Ser15, p21, und Chk1-S345. Vinculin diente als Ladekontrolle. Es wurden 15 µg Gesamtproteinlysate der OAW-42 Zellen zur Analyse verwendet. (siLu = siRNA gegen das Luciferasegen, CPL = Cisplatin)

Der Knockdown von ATM und ATR und die anschließende Behandlung der Zellen mit Cisplatin führt zur verminderten Expression von Transkripten ohne Exon 4 im Vergleich zu den Cisplatin Kontrollen (Abb. 4-31 A). Transkripte ohne Exon 6 sind nach Behandlung mit Cisplatin stark exprimiert. Durch vorherigen Knockdown von ATM und ATR ändert sich die Expression dieser Transkripte kaum. Hingegen gut zu erkennen ist die verstärkte Expression von Transkripten mit Exon 6 im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 4-31 A und B). Dieser Effekt konnte bereits durch den ATM/ATR-Inhibitor CGK733 gezeigt werden. Es kann daraus geschlossen werden, dass die Proteine ATM und ATR, bzw. eines in der Signalkaskade nachgeschalteten Proteine, einen direkten oder indirekten Einfluss auf das Herausspleißen von Exon 4 bzw. 6 haben.

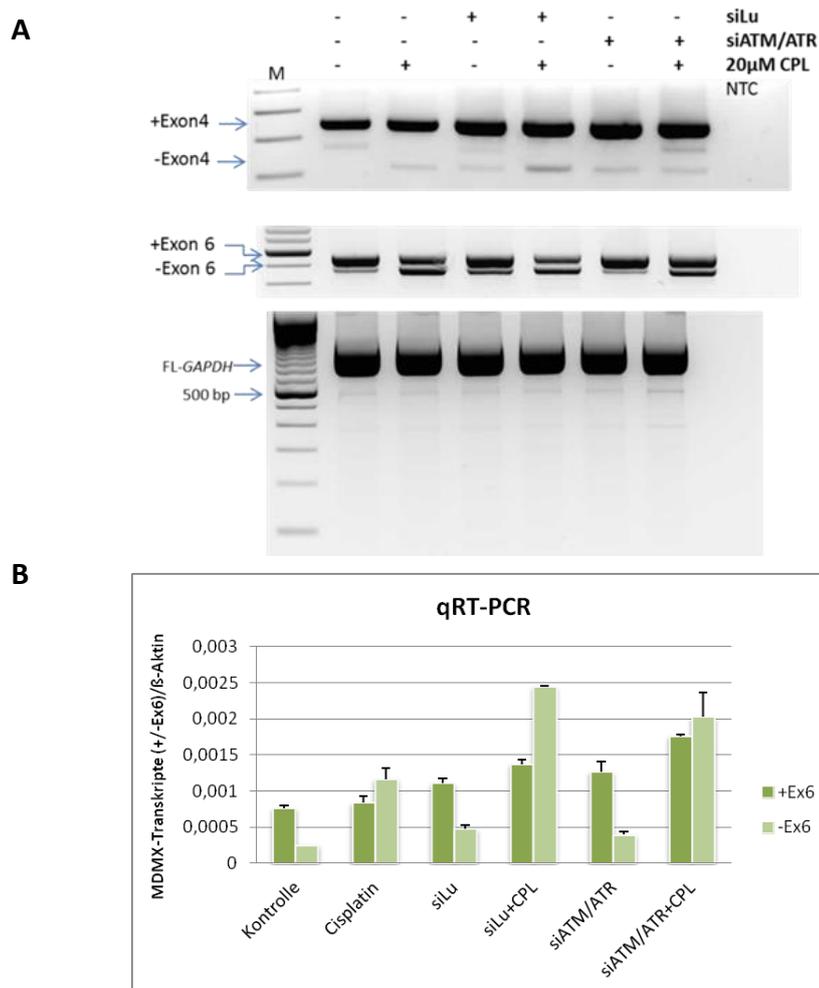


Abb. 4-31: Expression der MDMX-mRNA nach Knockdown von ATM und ATR mit siRNA

In **A** ist die Amplifikation des Exon 4 bzw. 6 in OAW-42 Zellen mit den Primern MDMX-139 und X487rev bzw. Ex3_4fw und Ex8_9rev im Agarosegel dargestellt. Die Expression des GAPDH (FL-GAPDH) dient als Beispiel für eine nicht alternativ gespleißte mRNA. **B** stellt mittels quantitativer Real-Time PCR das Verhältnis von Transkripten mit und ohne Exon 6 dar. Es wurden die Kopien pro μl gemessen und mit den erhaltenen Kopien des Housekeepinggens β -Aktin zur Normierung ins Verhältnis gesetzt. (M = 100 bp-Leiter, siLu = siRNA gegen das Luciferasegen, CPL = Cisplatin)

4.3.2 Einfluss des Tumorsuppressors p53 im alternativen Spleißprozess der MDMX-mRNA

Der Tumorsuppressor p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der in ca. 50 % der Tumoren mutiert ist [Hollstein et al. 1991]. Nach DNA-Schäden kann p53 DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest oder Apoptose auslösen. Die Aktivität von p53 wird u.a. durch die Mitglieder der MDM-Familie, MDM2 und MDMX, beeinflusst. In Tumoren werden von MDMX, wie unter 4.1 beschrieben, zahlreiche Spleißvarianten exprimiert. Einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten verschiedener alternativ gespleißter Transkriptvarianten der MDMX-mRNA nach DNA-Schäden und p53 konnte noch nicht gezeigt werden. Für die Untersuchungen zum Einfluss von p53 auf das alternative Spleißen der MDMX-mRNA wurden OAW-42 Zellen (wt-p53) und SKOV-3 Zellen (p53-null) verwendet.

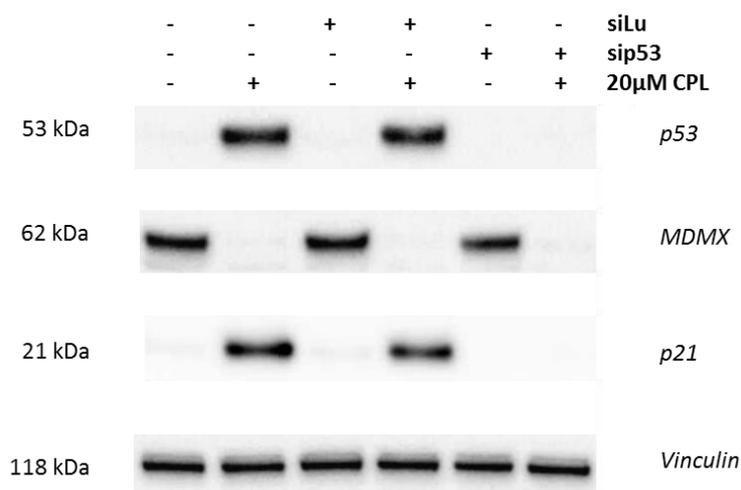


Abb. 4-32: Western-Blot nach Transfektion mit siRNA gegen p53

Die Expression von MDMX, p53 und p21 sind nach Transfektion von OAW-42 Zellen mit 10 nM siRNA gegen p53 und anschließender Cisplatin Behandlung dargestellt. Es wurden jeweils 15 µg Gesamtproteinlysate aus OAW-42 Zellen aufgetragen. Vinculin dient als Ladekontrolle. (siLu = siRNA gegen das Luciferasegen, CPL = Cisplatin)

OAW-42 Zellen sind mit 10 nM siRNA gegen p53 für 24 h behandelt worden. Unter diesen Bedingungen konnte ein Knockdown von über 90 % erzielt werden (Abb. 4-32). P21 ist ein Protein, welches nach DNA-Schäden durch p53 aktiviert wird und den Zellzyklusarrest (G1-Arrest) einleiten kann. Nach Hemmung der p53-mRNA mittels siRNA und anschließender Cisplatin Behandlung ist p21 nicht exprimiert. Dies zeigt, dass die durch p53-vermittelte Genexpression nach DNA-Schäden inaktiv ist. Interessant ist die MDMX Expression. MDMX ist in OAW-42 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin stark vermindert exprimiert. Auch nach Inhibierung der p53-vermittelten Genexpression ist MDMX nach Stressinduktion nicht exprimiert. Der Abbau von MDMX nach Cisplatin Behandlung kann durch Knockdown von p53 nicht verhindert werden (Abb. 4-32). Die Proteindaten deuten darauf hin, dass der Abbau von MDMX nicht durch p53 beeinflusst wird. Die stark verminderte Expression von MDMX kann zum einen durch den Abbau des Proteins und zum anderen durch verminderte Expression der FL-MDMX-mRNA entstehen. Um zu überprüfen, ob ein verringertes Transkriptionsniveau bzw. ein erhöhtes Spleißen zur Reduktion des MDMX-Proteinlevels führt, wurde die Expression der FL-MDMX-mRNA nach p53-Knockdown untersucht.

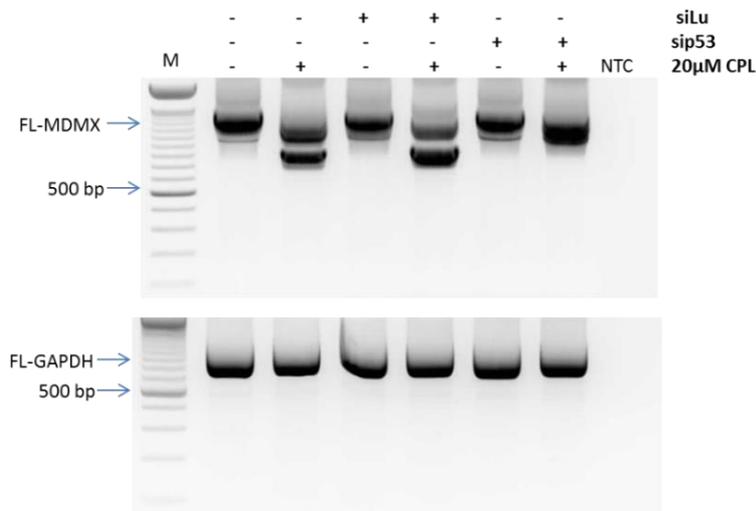


Abb. 4-33: Expression des gesamten Leserahmens der MDMX-mRNA

Der gesamte Leserahmen der MDMX-mRNA ist mittels nested PCR dargestellt worden. Die Expression des GAPDH (FL-GAPDH) dient als Beispiel für eine nicht alternativ gespleißte mRNA. (M = 100 bp-Leiter, siLu = siRNA gegen das Luciferasegen, CPL = Cisplatin, NTC = negativ Kontrolle)

Die FL-MDMX-mRNA ist nach p53-Knockdown im Vergleich zu den Kontrollen unverändert exprimiert (Abb. 4-33). Die Behandlung mit Cisplatin führt in den Zellen mit p53-Knockdown zu Veränderungen im Expressionsmuster. In den Cisplatin-Kontrollen sind zwei starke Banden zu sehen mit Transkriptgrößen von ca. 1100 bp und 800 bp. Im Vergleich dazu kann in den Zellen mit p53-Knockdown und Cisplatin Behandlung nur eine Bande detektiert werden, die Transkripte mit einer Größe zwischen 900 bp und 1200 bp enthält. Um diese besser charakterisieren zu können, wurden die Banden ausgeschnitten, aus dem Agarosegel eluiert und in Plasmidvektoren kloniert.

Nach Sequenzierung der Plasmide konnten zahlreiche Transkriptvarianten erhalten werden. In unbehandelten und Cisplatin behandelten Zellen konnte eine annähernd gleiche Verteilung von Transkriptvarianten, wie in Abb. 4-8 dargestellt ist, ermittelt werden. Jeweils ca. 50 % der ermittelten Transkripte der unbehandelten Kontrolle umfassten die FL-MDMX-mRNA Sequenz bzw. wiesen eine Deletion von Exon 6 auf. Transkripte aus Cisplatin behandelten Zellen hatten nahezu alle eine Deletion des Exon 6. Auffällig nach Knockdown von p53 war das Auftreten verkürzter Transkriptvarianten im Vergleich zu den Kontrollen. Hierbei konnten alternativ gespleißte Transkripte, wie z.B. MDMX-S, häufiger ermittelt werden, als die FL-MDMX-mRNA Sequenz. OAW-42 Zellen, die mit siRNA gegen p53 inkubierten und mit Cisplatin behandelten wurden zeigten eine veränderte Bildung

verkürzter Transkripte im Vergleich zu den Cisplatin-Kontrollen. Nahezu jede Transkriptvariante hatte zwar das Exon 6 deletiert, aber zusätzlich trat die Transkriptvariante MDMX-Alt2 deutlich vermehrt auf (Daten nicht gezeigt). MDMX-Alt2 ist charakterisiert durch die Deletion der Exone 4-9. Diese verstärkte Expression einer einzelnen Spleißvariante nach p53-KD und anschließender Cisplatin Behandlung zeigt den Einfluss von p53 beim Spleißen der MDMX-mRNA.

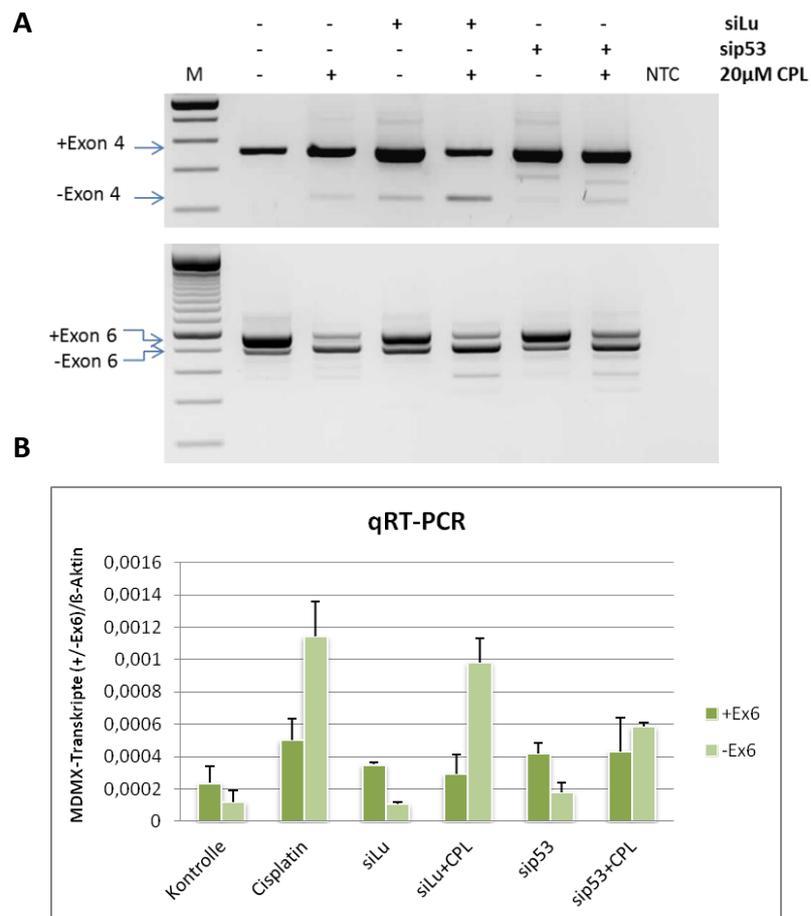


Abb. 4-34: Expression der MDMX-mRNA nach Knockdown von p53 in OAW-42 Zellen

In **A** ist die Amplifikation des Exon 4 bzw. 6 mit den Primern MDMX-139 und X487rev bzw. Ex3_4fw und Ex8_9rev im Agarosegel dargestellt. **B** stellt mittels quantitativer Real-Time PCR das Verhältnis von Transkripten mit und ohne Exon 6 dar. Es wurden die Kopien pro µl gemessen und mit den erhaltenen Kopien des Housekeepinggens β-Aktin zur Normierung ins Verhältnis gesetzt. (M = 100 bp-Leiter, NTC = negativ Kontrolle, CPL = Cisplatin)

Die Behandlung von OAW-42 Zellen mit Cisplatin führt zum Exon 4 Skipping (Abb. 4-34 A). Nach Knockdown von p53 und anschließender Behandlung der Zellen mit Cisplatin kommt es ebenfalls zur erhöhten Expression von Transkripten ohne Exon 4 im Vergleich zur Kontrolle. Exon 6 Skipping ist ebenso nach Behandlung mit Cisplatin eindeutig detektierbar. Der Knockdown von p53 und die anschließende Behandlung der OAW-42 Zellen mit Cisplatin

führt zu einer leichten Verringerung der Expression von Transkripten ohne Exon 6. Deutlich zu erkennen ist die verstärkte Expression der Transkripte mit Exon 6 im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 4-34 A). Darüber hinaus ist die annähernd gleich starke Expression beider Transkripte nach p53-KD und anschließender Cisplatin Behandlung auffällig (Abb. 4-34 B). Dies deutet darauf hin, dass p53 eine Rolle beim Spleißen der MDMX-mRNA spielt, aber das Spleißen selbst nur indirekt beeinflusst. Das Vorhandensein von DNA-Schäden führt zur Aktivierung von p53. Das Fehlen von p53 durch Knockdown verhindert vermutlich die Aktivierung von Zielproteinen, die das Spleißen regulieren.

Zum Vergleich wurde mit SKOV-3 Zellen gearbeitet, die kein p53-Protein besitzen. Durch die Verwendung von p53-null Zellen sollte die Einflussnahme von p53 beim Spleißen der MDMX-mRNA vergleichend zu OAW-42 Zellen beurteilt werden. In SKOV-3 Zellen ist p53 über einen Expressionsvektor, der einen HA-Tag trägt, transfiziert worden. Zur Analyse einer erfolgreichen Transfektion ist das Gesamtprotein der SKOV-3 Zellen isoliert und im Western-Blot untersucht worden. Es wurde der HA-Tag des Expressionsvektors mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Nur Zellen, die den Expressionsvektor aufnehmen, können p53 mit HA-Tag exprimieren. Es ist eine gleichmäßig starke Bande von p53 mit HA-Tag in den transfizierten SKOV-3 Zellen detektiert worden. Dies zeigt eine vergleichbare Transfektionseffizienz und damit eine gute Voraussetzung für die weiteren Nachweise (Abb. 4-35).

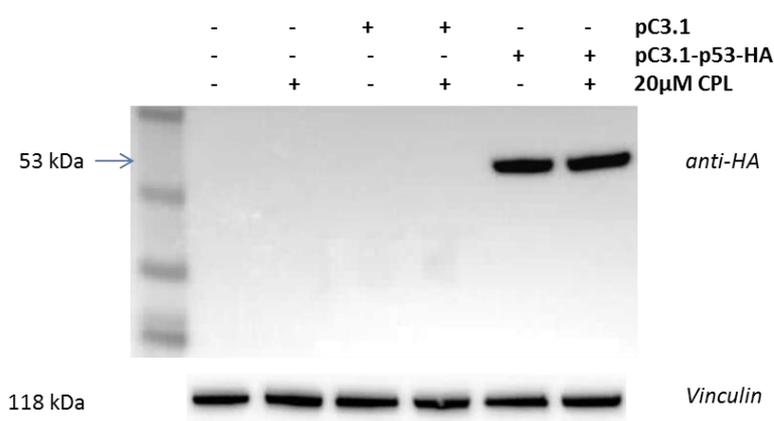


Abb. 4-35: Western-Blot zur Analyse der erfolgreichen Transfektion des pC3.1 p53-Expressionsvektors

p53 wurde über dessen HA-Tag mittels spezifischen Antikörpers in SKOV-3 Zellen nachgewiesen. Es wurden 15 μ g Gesamtprotein zur Analyse eingesetzt. Vinculin diente als Ladekontrolle. (pC3.1 = Leervektor, pC3.1-p53-HA = p53-Expressionsvektor mit HA-Tag, CPL = Cisplatin)

Bevor das Spleißen der MDMX-mRNA in SKOV-3 Zellen untersucht werden konnte, ist überprüft worden, ob bei diesen Zellen, ähnlich wie bei OAW-42 Zellen, nach Cisplatin

Behandlung MDMX vermindert exprimiert wird. Die Behandlung von SKOV-3 Zellen mit Cisplatin führt ebenfalls zur Reduktion des MDMX-Proteinlevels. Diese stressinduzierte MDMX Degradierung wird durch Überexpression von p53 nicht beeinflusst (Abb. 4-36).

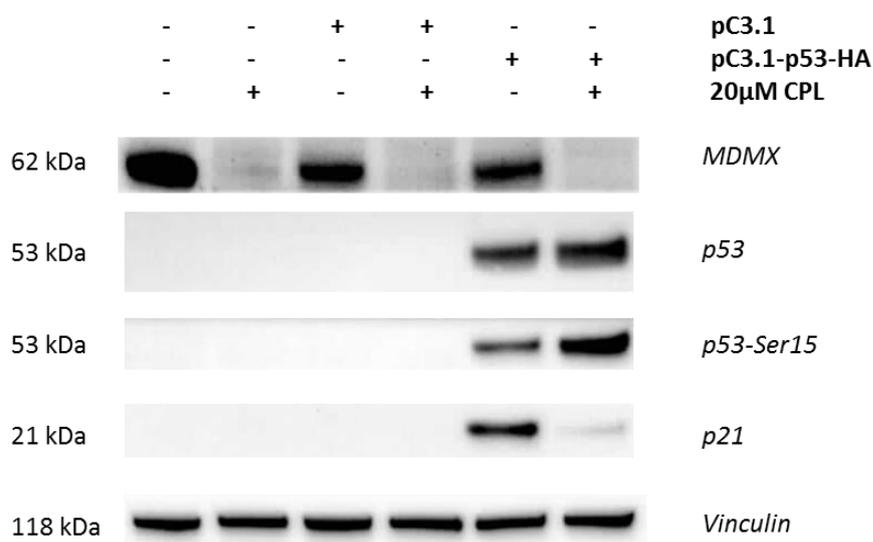


Abb. 4-36: Western-Blot nach Transfektion des p53-Expressionsvektors in SKOV-3 Zellen

Die Expression von MDMX, p53 und dessen Phosphorylierung am Serin 15, sowie das p21-Protein sind dargestellt. Es wurden jeweils 15 µg Gesamtproteinlysate aufgetragen. Vinculin dient auch hier als Ladekontrolle. (pC3.1 = Leervektor, pC3.1-p53-HA = p53-Expressionsvektor mit HA-Tag, CPL = Cisplatin)

Nach Behandlung von SKOV-3 Zellen mit Cisplatin kommt es hingegen nicht zur verstärkten Expression von p21, was wahrscheinlich mit dem Fehlen von p53 zusammen hängt. In SKOV-3 Zellen mit p53-Expressionsvektor kann p53 nachgewiesen werden. Das alleinige Vorhandensein dieses exogenen p53 führt in SKOV-3 Zellen bereits zur Phosphorylierung von p53 am Serin 15 und zur verstärkten Expression von p21. Durch den starken Promotor des Expressionsvektors werden unzählige p53-mRNAs produziert, die nach Translation in den SKOV-3 Zellen als funktionelle p53-Proteine vorliegen. So kann das exogen entstandene p53 als Transkriptionsfaktor die Genexpression einzelner Zielgene, wie z.B. p21, aktivieren. Diese Signalkaskade wird in wt-p53 Zellen, wie OAW-42, erst nach Stressinduktion angeschaltet. Nach Behandlung der SKOV-3 Zellen mit Cisplatin, die exogenes p53 exprimieren, kommt es verstärkt zur Phosphorylierung von p53 am Serin 15. Dies zeigt die Funktionalität von exogenem p53. Der p21-Proteinlevel sinkt aber nach Stressinduktion. Dies könnte mehrere Gründe haben. SKOV-3 Zellen besitzen unter physiologischen Bedingungen kein p53. Daher hat die Zelle vermutlich Strategien entwickelt auf Stress zu reagieren, die unabhängig von

p53 sind. Des Weiteren könnte die Cisplatin Behandlung in SKOV-3 Zellen nicht Zellzyklusarrest, sondern Apoptose auslösen.

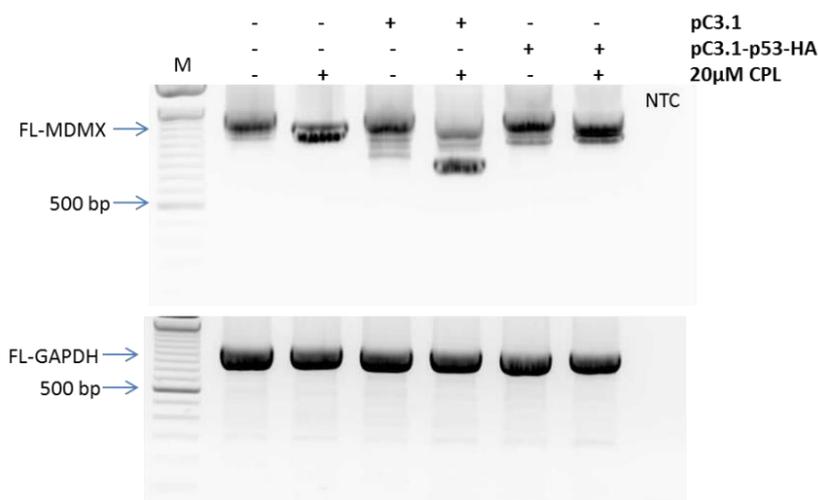


Abb. 4-37: Expression des gesamten Leserahmens der MDMX-mRNA in SKOV-3 Zellen

Der gesamte Leserahmen der MDMX-mRNA ist mittels nested PCR dargestellt worden. Die Expression des GAPDH (FL-GAPDH) dient als Beispiel für eine nicht alternativ gespleißte mRNA. (M = 100 bp-Leiter, NTC = negativ Kontrolle, pC3.1 = Leervektor, pC3.1-p53-HA = p53-Expressionsvektor mit HA-Tag, CPL = Cisplatin)

Wichtig für die Untersuchungen zum Einfluss von p53 auf das Spleißen der MDMX-mRNA ist, dass der Proteinlevel von MDMX in SKOV-3 Zellen nach Cisplatin Behandlung sinkt und dass das exogene p53 in SKOV-3 Zellen funktionell aktiv ist. Nach Amplifikation des gesamten Leserahmens der FL-MDMX-mRNA ist kein Unterschied in der Expression der MDMX-mRNA in den Kontrollproben mit und ohne exogenem p53 zu erkennen (Abb. 4-37). Die Behandlung mit Cisplatin führt in allen Versuchsansätzen zur Entstehung verkürzter Transkripte. Das Bandenmuster weist keine Charakteristika auf, die auf eine p53-abhängige Regulation hindeuten.

Zur genaueren Analyse des Zusammenhangs zwischen p53 und dem alternativen Spleißen einzelner Exone der MDMX-mRNA wurden erneut das Herausspleißen von Exon 4 und 6 untersucht. SKOV-3 Zellen exprimieren bereits ohne Behandlung mit einem DNA-schädigendem Agens Transkripte ohne Exon 4. Nach Cisplatin Behandlung kommt es dann zum verminderten Exon 4 Skipping (Abb. 4-38 A). Es ist allerdings kein Unterschied zwischen SKOV-3 Zellen mit und ohne exogen exprimiertem p53 zu detektieren.

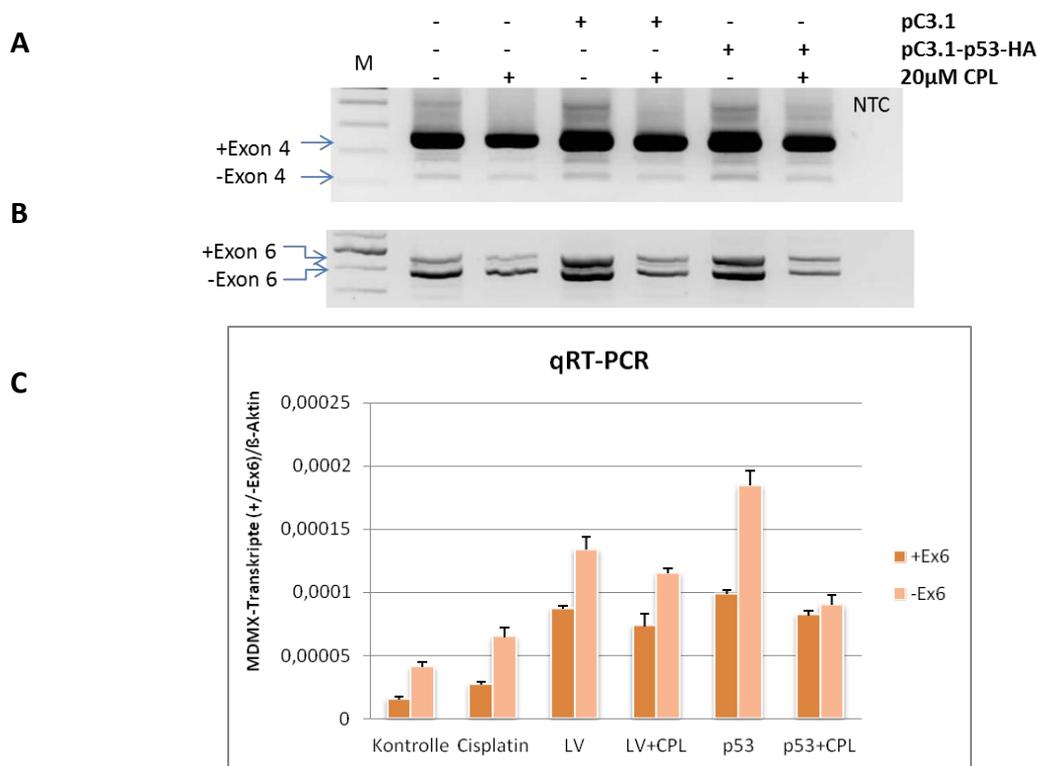


Abb. 4-38: Expression der MDMX-mRNA in SKOV-3 Zellen

In A ist die Amplifikation des Exon 4 bzw. 6 mit den Primern MDMX-139 und X487rev bzw. Ex3_4fw und Ex8_9rev im Agarosegel dargestellt. B stellt mittels quantitativer Real-Time PCR das Verhältnis von Transkripten mit und ohne Exon 6 dar. Es wurden die Kopien pro µl gemessen und mit den erhaltenen Kopien des Housekeepinggens β-Aktin zur Normierung ins Verhältnis gesetzt. (M = 100 bp-Leiter, NTC = negativ Kontrolle, pC3.1 = Leervektor (LV), pC3.1-p53-HA = p53-Expressionsvektor mit HA-Tag (p53), CPL = Cisplatin)

Hingegen werden Transkripte ohne Exon 6 unabhängig von einer Cisplatin Behandlung in SKOV-3 Zellen stärker exprimiert als Transkripte mit Exon 6. Eine Auffälligkeit zeigen Cisplatin behandelte SKOV-3 Zellen, die exogenes p53 exprimieren. Hier sind Transkripte mit und ohne Exon 6 nahezu gleich stark exprimiert (Abb. 4-38 B und C). Dieser zwar geringe Unterschied im Expressionsniveau der Transkripte lässt trotz allem vermuten, dass das Spleißen der MDMX-mRNA von p53 beeinflusst wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es durch Knockdown von p53 in OAW-42 Zellen zum veränderten Spleißen der MDMX-mRNA kam. Die Behandlung der Zellen mit Cisplatin führte zum vermehrten Exon 4 und 6 Skipping. Durch vorherigen KD von p53 ergab sich ein geringeres Spleißen dieser Exone trotz Cisplatin Behandlung. In SKOV-3 Zellen war das Exon 6 Skipping ausschließlich nach Überexpression von p53 und Cisplatin Behandlung verändert. Das Spleißen der MDMX-mRNA ist vermutlich indirekt durch p53 beeinflusst, wenn funktionell aktives p53 vorhanden ist.

5. Diskussion

MDMX ist neben MDM2 ein wichtiger negativer Regulator des Tumorsuppressors p53. Ramos et al. (2001) postulierten einen Zusammenhang zwischen der Überexpression von MDMX bzw. MDM2 und wt-p53 Tumorzellen. Dabei wurden 19 Zelllinien verschiedener Tumorarten und unterschiedlichem p53-Status hinsichtlich deren Expressionsniveaus von MDMX, MDM2 und p53 untersucht. Die Überexpression von MDMX ging oftmals einher mit der verstärkten Expression von MDM2 und trat gehäuft in wt-p53 Zellen auf. Zelllinien mit nur geringer MDMX-Expression zeigten keine p53-Proteinexpression. Dies lässt die regulatorische Beziehung zwischen MDMX, MDM2 und p53 erkennen. Darüber hinaus konnten in Tumoren bereits zahlreiche Spleißvarianten von MDMX identifiziert werden. Bisher ist aber nur wenig über regulatorische Funktionen einzelner Spleißvarianten im Zusammenspiel zwischen p53, MDMX und MDM2 bekannt. Eine gut charakterisierte Spleißvariante von MDMX ist die MDMX-S-mRNA. Durch das alternative Spleißen von Exon 6 kommt es zur Leserahmenverschiebung und vorzeitigen Stoppkodon im Exon 7. Das Verhältnis der MDMX-S-mRNA zur full-length Sequenz ist ein negativer prognostischer Marker [Lenos et al. 2012]. Neben MDMX-S existieren noch weitere Spleißvarianten von MDMX. Mit dieser Arbeit ist übergeprüft worden, welche Spleißvarianten nach einem DNA-Schaden gebildet werden. Darüber hinaus wurde die Variante MDMX-S weiter charakterisiert, indem die Stabilität dieser mRNA überprüft wurde. Ebenso identifiziert wurden Spleißfaktoren, die am Spleißen von Exon 6 beteiligt sind. Abschließend wurde untersucht, welchen Einfluss einzelne Proteine des DNA-Damage-Pathways in Bezug auf das Spleißen der MDMX-mRNA haben.

5.1 MDMX-Expression nach DNA-Schäden

Chandler et al. (2006) untersuchten das Spleißen der MDM2- und MDMX-mRNA nach Stressinduktion (UV, Cisplatin) und postulierten, dass die Varianten MDM2/X-Alt1 bzw. -Alt2 das p53-Protein funktionell regulieren können. Evans et al. konnten zeigen, dass MDM2-Alt1 an MDM2 binden und dadurch p53 aktiviert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde das Spleißverhalten von MDMX nach Behandlung mit zwei verschiedenen Zytostatika untersucht, da die Art der Stressinduktion zu verschiedenartigen Spleißeffekten führen kann [Lakin et al. 1999]. Cisplatin erzeugt Doppelstrang-, dagegen Camptothecin Einzelstrang-

brüche in der DNA. OAW-42 Zellen zeigen nach Behandlung mit Cisplatin bzw. Camptothecin eine Beeinflussung des Spleißens der MDMX-mRNA in Abhängigkeit von der Zeit und der verwendeten Zytostatikadosis. Die Zellen reagierten erst ab einer Dosis von 20 μM Cisplatin, was dem LD_{50} -Wert entspricht und 18 Stunden Inkubation mit erhöhten alternativen Spleißern von Exon 6 der MDMX-mRNA. Dagegen bedurfte es des LD_{40} -Wertes für Camptothecin (8 μM) und einer 24-stündigen Behandlung, um mit diesem Zytostatikum erhöhtes Exon 6 Skipping zu erzielen. Unter diesen Bedingungen ist das Spleißen der MDMX-mRNA näher betrachtet worden.

Nach der Behandlung von OAW-42 Zellen mit Cisplatin bzw. Camptothecin sind 21 alternativ bzw. aberrant gespleißte Varianten identifiziert worden. Anhand vorhandener Domänen ließen sich diese in Gruppen einteilen. 13 der 21 Spleißvarianten besaßen die p53-BD und hätten damit die Möglichkeit, an p53 zu binden und dessen transkriptionelle Aktivität zu inhibieren. Eine dieser Varianten ist die MDMX-S-mRNA. Für diese Variante konnte *in vitro* bereits gezeigt werden, dass es im Vergleich zum FL-MDMX-Transkript stärker an p53 binden kann. Die durch p53-vermittelte Genexpression wird auf diese Weise effektiver inhibiert [Rallapalli et al. 1999, de Graaf et al. 2003]. Auch Prodosmo et al. (2008) konnten zeigen, dass MDMX-Isoformen (MDMX-211 und MDMX-S) im Vergleich zu FL-MDMX *in vitro* stärkere inhibitorische Aktivität gegenüber p53 zeigten. Durch diese Arbeit konnte aber nachgewiesen werden, dass die MDMX-S-mRNA ein Substrat des NMD darstellt. Damit wird es nicht in ein Protein translatiert und kann nicht, wie Rallapalli et al. (1999) postulierten, *in vivo* durch Interaktion mit p53 dessen Funktion inhibieren. Unter Stressbedingungen geht die vermehrte Expression der MDMX-S-mRNA einher mit dem Abbau des FL-MDMX-Proteins. Daher haben das erhöhte Spleißen und die Entstehung von MDMX-Isoformen, die auch Substrate des NMD sind, sicher die Verringerung des FL-MDMX-Proteinlevels zum Ziel. MDMX-Isoformen, die keine NMD-Substrate sind, könnten wiederum mit FL-MDMX um die p53-Bindung konkurrieren.

Darüber hinaus wiesen 5 von 21 Spleißvarianten mRNA-Sequenzen auf, die für die Zn-Finger- und RING-Domäne kodieren. Über die RING-Domäne ist FL-MDMX in der Lage, an FL-MDM2 zu binden. Von MDM2 sind bereits Isoformen bekannt, die *in vitro* funktionell aktiv sind. Die Variante MDM2-Alt1, die ebenfalls nur aus der Zn-Finger- und RING-Domäne besteht, wird nach UV-Bestrahlung verstärkt gespleißt [Chandler et al. 2006]. Evans et al. (2001) zeigten, dass MDM2-Alt1 über direkte Proteininteraktion mit FL-MDM2 interagiert. Dadurch kam es

zur p53-Aktivierung und zur Induktion der p53-vermittelten Stressantwort. In Anbetracht dessen könnten die MDMX-Isoformen ebenfalls über die RING-Domäne an MDMX binden und p53 regulieren. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit der Heterodimerbildung mit FL-MDM2. MDMX/MDM2-Heterodimere sind stabiler als Monomere und können p53 effektiver ubiquitinylieren sowie für den proteasomalen Abbau markieren [Sharp et al. 1999, Tanimura et al. 1999]. Die Heterodimerbildung zwischen Isoformen von MDMX mit FL-MDM2 bzw. FL-MDMX und Isoformen von MDM2, aber auch die Proteininteraktion zweier Isoformen, stellt weitreichende Möglichkeiten der Regulation von p53, MDM2 und MDMX dar. Vier der Spleißvarianten besitzen, zusätzlich zur Zn-Finger- und RING-Domäne, die p53-BD. Derartige Isoformen könnten ebenso an p53 binden und die durch p53-vermittelten Genexpression inhibieren [Rallapalli et al. 1999, de Graaf et al. 2003]. Unter der Voraussetzung der Translation solcher Spleißvarianten in ein funktionell aktives Protein eröffnet sich eine regulatorische Ebene, in der Spleißvarianten die Funktionen des FL-Proteins verstärken könnten.

Vier der 21 Spleißvarianten besaßen, auf Grund von Deletionen mehrerer Exone, keine mRNA-Sequenz, die vollständig für eine Domäne von MDMX kodiert. Exon Skipping nach Stressinduktion hat vermutlich das Ziel der Reduktion des FL-MDMX-Proteins. Bei Schilddrüsenkarzinomen konnte erstmals eine signifikant verringerte FL-MDMX-Expression und eine verstärkte Expression von MDMX-Isoformen detektiert werden. Prodosmo et al. (2008) postulierten daher, dass die Reduktion von FL-MDMX, neben der p53-Inaktivierung, eine wichtige Rolle im Überleben dieses Tumortyps darstellt. Platinhaltige Verbindungen, wie Cisplatin, werden zur Therapie des Ovarialkarzinoms eingesetzt. Ein Problem dieser Therapie ist die Entwicklung zellulärer Resistenzen gegen Platinverbindungen. Das nach Cisplatin Behandlung erhöhte Exon Skipping in der Ovarialkarzinomzelllinie OAW-42 könnte daher ebenso eine Überlebensstrategie dieser Tumorart sein. Für andere Tumorarten ist bereits bekannt, dass eine erhöhte MDMX-S-mRNA Expression mit einem verkürzten Überleben dieser Patienten korreliert [Rallapalli et al. 1999, Bartel et al. 2005, Jochemsen et al. 2010, Liu et al. 2012]. Stölting et al. (2014) untersuchten die auf Cisplatin-basierte Resistenz in der Ovarialkarzinomzelllinie A2780. Diese Gruppe konnte zeigen, dass freies Cisplatin in A2780 Zellen den intrinsischen Apoptoseweg induziert, wodurch u.a. Cytochrom C und p53 durch das Mitochondrium freigesetzt werden. Hingegen aktiviert liposomales Cisplatin den extrinsischen Apoptoseweg. Durch die Nutzung des extrinsischen Weges kann liposomales

Cisplatin A2780-Cisplatin resistente Zellen in den Zelltod führen [Stölting et al. 2014]. Zusammengefasst kann freies Cisplatin Tumorzellen in Apoptose führen. Durch erhöhtes Exon Skipping und der damit verbundenen Entstehung von MDMX-Isoformen ist es möglich, dass Tumorzellen Resistenzen ausbilden, vermutlich wegen Veränderungen im Gleichgewicht zwischen MDMX, MDM2 und p53. Solche Tumorzellen, die aufgrund der Behandlung eine zelluläre Resistenz bilden, können durch liposomales Cisplatin wieder sensitiv für Apoptose werden. Diese Erkenntnis stellt neue Möglichkeiten der Therapie resistenter Tumoren dar.

Sowohl die Behandlung mit Cisplatin, als auch mit Camptothecin, führte in OAW-42 Zellen zum Anstieg von Transkripten mit alternativ gespleißtem Exon 6 um ca. 30 %. Solch ein starker Anstieg des Exon 6 Skipping nach DNA-Schäden zeigt die Einflussnahme des DNA-Damage-Pathways auf das Spleißen der MDMX-mRNA. Darüber hinaus wird deutlich, dass aufgrund des erhöhten Spleißens von Exon 6 der FL-MDMX-Proteinlevel stark reduziert wird, was vermutlich Auswirkungen im Gleichgewicht zwischen p53, MDMX und MDM2 hat. Ein verminderter FL-MDMX-Proteinlevel führt, wegen fehlender Heterodimerbildung mit MDM2, zur Stabilisierung von p53. Dadurch kann p53, in Abhängigkeit des DNA-Schadens, die Transkription von Zielgenen der DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest bzw. Apoptose aktivieren. Bei geringfügiger Schädigung erfolgt die Reparatur der DNA, was wiederum zum Wachstum des Tumors führt. Die Aktivierung der Apoptose erfolgt bei irreparabler Schädigung der DNA, was die Verringerung des Tumors zur Folge hätte. Da ein erhöhter MDMX-S-mRNA-Level ein negativer prognostischer Marker in einigen Tumorarten ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Stabilisierung von p53 die Aktivierung von DNA-Reparaturgenen und das Überleben des Tumors nach sich zieht [Lenos et al. 2012].

Markey und Berberich beschrieben 2008, dass der Gesamttranskriptlevel von MDMX nach Stressinduktion (Cisplatin) in einigen Tumorzelllinien, u.a. HCT116 Zellen, sinkt. In dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass sowohl nach Inkubation von OAW-42 Zellen mit Cisplatin als auch mit Camptothecin der Gesamttranskriptlevel von MDMX nahezu konstant bleibt. Markey und Berberich verwendeten darüber hinaus MCF-7 Zellen, die als einzige Zelllinie des Versuchsansatzes ein konstantes MDMX-Gesamttranskriptlevel nach Stressinduktion zeigten. Daraus lässt sich schließen, dass die Transkriptionseffizienz von MDMX gewebsspezifisch reguliert wird. Gewebsunabhängig ist die Reduktion des MDMX-Proteinlevels nach genotoxischem Stress. Der Abbau von MDMX erfolgt u.a. durch direkte

Phosphorylierung von ATM am Serin 403, nahe der RING-Domäne von MDMX. Dieses Signal führt zum MDM2-vermittelten Abbau von MDMX durch das Proteasom [Pereg et al. 2005, Chen et al. 2005]. Eine chemotherapeutische Behandlung von Tumoren, z.B. die Therapie des Ovarialkarzinoms mit Cisplatin, führt zum verstärkten alternativen Spleißen von Exon 6, welche die Reduktion des FL-MDMX-Proteins bedingt. Die daraus resultierende Stabilisierung von p53 würde eine schnelle Beseitigung des DNA-Schadens nach sich ziehen und die schlechte Überlebensprognose von Patienten mit erhöhter MDMX-S-mRNA im Vergleich zur FL-MDMX Sequenz erklären [Rallapalli et al. 1999, Bartel et al. 2005, Jochemsen et al. 2010, Liu et al. 2012].

5.2 MDMX-S ist ein Substrat des NMD

MDMX-S ist eine der am häufigsten beschriebenen Transkriptvarianten von MDMX. Diese Isoform ist charakterisiert durch ein vorzeitiges Stoppkodon (PTC bei Nukleotid 651) im Exon 7. Dieses PTC entsteht aufgrund der Deletion von Exon 6 und der daraus resultierenden Leserahmenverschiebung. mRNAs, die durch Leserahmenverschiebung ein PTC bilden, könnten Substrate des *nonsense-mediated mRNA-decay* (NMD) sein [Hwang et al. 2010]. In dieser Arbeit konnte die MDMX-S-mRNA als Substrat des NMD identifiziert werden. In OAW-42 Zellen bildeten 16 der insgesamt 21 ermittelten Spleißvarianten, die unter 4.1 beschrieben sind, ein PTC. Sechs der 16 Varianten sind durch das gleiche vorzeitige Stoppkodon (PTC bei 651) wie MDMX-S charakterisiert und wahrscheinlich ebenfalls Substrate des NMD. Die anderen 10 Spleißvarianten erzeugen je 1 PTC, aber im Ganzen weitere 6 PTCs (PTC bei Nukleotid 467, 569, 669, 677, 1031 bzw. 1259). Auch für diese 10 Transkripte besteht die Möglichkeit, Substrate des NMD zu sein, da diese die gleichen Voraussetzungen zeigen wie die MDMX-S-mRNA.

Zentrale Proteine des NMD-Pathways sind die Proteingruppen Upf und SMG [Chang et al. 2007]. Eines der wichtigsten Upf-Proteine ist das Upf1. Upf1 wird nach Erkennung eines PTC durch den Translationsapparat zur mRNA rekrutiert. Dies führt zur Einleitung des NMD [Kashima et al. 2006]. SMG-Proteine sind die zweite wichtige Proteingruppe der NMD-Maschinerie und regulieren durch Phosphorylierung (SMG-1) bzw. Dephosphorylierung (SMG-5, 6, 7) von Upf1 den NMD [Wilkinson et al. 2003]. Die Inhibierung des NMD durch Knockdown des Upf1-Proteins führt zur Anhäufung von NMD-Substraten im Zytoplasma

[Gehring et al. 2005]. In OAW-42 Zellen wurde die MDMX-S-mRNA nach Upf1-KD erhöht exprimiert und konnte so als NMD-Substrat identifiziert werden. Die Klärung der Frage, ob die MDMX-S-mRNA in ein Protein translatiert wird hat klinische Relevanz, da verschiedene Studien zeigten, dass die MDMX-S-mRNA in einigen Tumorgeweben verstärkt exprimiert vorlag. Darüber hinaus korrelierte das Verhältnis der MDMX-S-mRNA zum FL-MDMX-Transkript größer eins mit einem schlechteren Überleben dieser Tumorpatienten [Rallapalli et al. 1999, Bartel et al. 2005, Jochemsen et al. 2011, Liu et al. 2012]. Die genannten Studien zeigten eine erhöhte Expression der MDMX-S-mRNA in den Tumorproben, obwohl die MDMX-S-mRNA ein NMD-Substrat ist. Auch in OAW-42 Zellen stieg die Expression der MDMX-S-mRNA nach Behandlung mit Cisplatin bzw. Camptothecin stark an. Karam et al. (2013) konnten zeigen, dass in Tumoren der NMD durch intrinsische und extrinsische Faktoren gestört sein kann. Solche Faktoren können Veränderungen im Transkriptionslevel von NMD-Substraten bewirken, was *downstream* zu pathologischen Konsequenzen führen kann. Darüber hinaus ist oftmals der NMD in Tumoren durch zellulären Stress inhibiert [Wang et al. 2011]. Dies könnten Erklärungen für die starke Anhäufung der MDMX-S-mRNA nach Chemotherapie bei einigen Tumorpatienten sein. Das erhöhte Expressionslevel der MDMX-S-mRNA ist in den oben genannten 4 Tumorarten ein negativer prognostischer Marker [Lenos et al. 2012]. Der NMD ist in diesen Tumorarten wahrscheinlich inhibiert. Da es bisher keine weiteren Studien gab, liegt die Vermutung nahe, dass die Inhibierung des NMD durch zellulären Stress oder veränderter Expression von Faktoren gewebspezifisch ist. Des Weiteren konnten Bruno et al. (2011) zeigen, dass die Upf1-Sequenz eine Bindestelle für die miRNA-128 besitzt. Durch direkte Bindung kann diese miRNA den Abbau von NMD-Substraten verhindern. Solch ein Mechanismus ist ebenfalls eine Erklärung für die Unterdrückung des NMD in Tumoren. Auch die vorhandene erhöhte Expression von MDMX-S in verschiedenen Tumorgeweben und nach Behandlung von OAW-42 Zellen mit Zytostatika könnte durch solch einen Mechanismus zu begründen sein.

Des Weiteren werden durch den NMD ebenfalls Transkripte von mutierten, aber auch von „normalen“ Genen degradiert [Mendell et al. 2004, Chan et al. 2007]. Perrin-Vidoz et al. (2002) beschrieben die Bedeutsamkeit des Abbaus der BRCA1-mRNA vom mutierten BRCA1-Gen durch den NMD als anti-Tumor Wirkung. Im Gegensatz dazu zeigten Karam et al. (2008), dass die CDH1-mRNA, die von dem mutierten CDH1-Gen stammte, durch den NMD abgebaut wird, und dass dieser Abbau der mutierten mRNA zum früheren Ausbruch des angeborenen

diffusen Magenkarzinoms (HDGC) führt. Zusammengefasst hat ein funktionierender NMD im Beispiel der BRCA1-mRNA eine Anti-Tumor Wirkung, hingegen unterstützt der NMD-vermittelte Abbau der CDH1-mRNA die Tumorentstehung. Im Vergleich dazu ist die negative Korrelation der erhöhten MDMX-S-mRNA Expression mit dem Überleben verschiedener Tumorpatientengruppen durch die Inhibierung des NMD begründet. Dies zeigt die verschiedenartige Regulation durch den NMD. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Regulation von Transkripten, die von „normalen“ Genen stammen. Solche Substrate des NMD sind konservierte mRNAs, die für RNA-Bindeproteine, ribosomale Proteine oder für stressregulierende Gene kodieren [a de Lima Morais et al. 2010]. Die meisten konservierten NMD-Substrate kodieren für Proteine, die das Spleißen regulieren [Saltzman et al. 2008]. Daher spielt der NMD womöglich eine wichtige Rolle in der Regulation des Spleißens. Gudikote et al. (2005) konnten zeigen, dass der NMD das Spleißen beeinflusst und das Spleißen den NMD reguliert. Sank die Spleißeffizienz, war auch der NMD unterdrückt und umgekehrt. Dies zeigt nochmals die Einflussnahme verschiedener Mechanismen am Spleißen von mRNAs, deren Regulation und Abbau.

5.3 Regulation des Spleißens von Exon 6 durch die Spleißfaktoren PUF60 und hnRNP-C

Alternativ gespleißte Exone weisen konservierte Bereiche der Intronsequenzen auf [Yeo et al. 2007]. Ein evolutionär konservierter Sequenzbereich von MDMX mit einer über 90 %igen Homologie zwischen Mausgenom und humanem Genom lag von *upstream* 75 nt des Exon 6 bis *downstream* 235 nt. Zur Identifizierung von Spleißfaktoren, die am Ausschluss von Exon 6 der MDMX-mRNA beteiligt sind, wurde der Sequenzbereich *upstream* 199 nt bis *downstream* 285 nt untersucht. PUF60 und hnRNP-C konnten als Bindeproteine der MDMX-mRNA in diesem Sequenzbereich bestimmt werden. Wollerton et al. (2004) konnten zeigen, dass der Branchpoint 351 nt *upstream* von Exon 11 des Spleißproteins PTB liegt. Der Sequenzbereich zwischen Branchpoint, welcher nahe dem Polypyrimidin-Trakt liegt, und der 3`Spleißstelle wies eine über 90 %ige Übereinstimmung zwischen Mausgenom und humanem Genom auf. Abgeleitet von dieser Erkenntnis ist zu vermuten, dass der für MDMX ausgewählte Sequenzbereich alle erforderlichen Signale der Spleißmaschinerie enthält und damit eine gute Grundlage zur Identifizierung von Spleißfaktoren bietet.

PUF60 ist ein Polypyrimidin-Trakt bindendes Protein, das 1999 durch Page-McCaw et al. erstmals beschrieben wurde. Der Polypyrimidin-Trakt liegt zusammen mit dem Branchpoint am weitesten *upstream* der 3`-Spleißstelle. Durch die hohe Sequenz-homologie der verwendeten Intronbereiche im Vergleich zwischen Mausgenom und humanem Genom ist zu vermuten, dass die genannten Signale, die zum Spleißen von Introns benötigt werden, enthalten sind. PUF60 ist ein Homolog von U2AF(65), der großen Untereinheit des bekanntesten Polypyrimidin-Trakt-Bindeproteins U2AF [Hastings et al. 2007]. Nach Knockdown von PUF60 kam es u.a. zur verminderten MDMX-mRNA Expression und ebenfalls zum Verlust des MDMX-Proteins. Folgernd ist vermutlich bereits die Transkription von MDMX gehemmt. In der Literatur sind dazu keine Informationen zu finden, dass PUF60 einen Einfluss auf die Transkriptionseffizienz einzelner Gene haben könnte. Allende-Vega et al. (2013) beschrieben den Zusammenhang zwischen dem Tumorsuppressor p53 und der Spleißmaschinerie. In deren Fokus stand u.a. das Spleißprotein SF3B1. Nach Knockdown von SF3B1 kam es zur Aktivierung von p53 und zur Reduktion der Gesamttranskriptmenge von MDMX. SF3B1 ist ein Bindepartner von PUF60 [Corsini et al. 2009]. Dies zeigt, dass die Spleißproteine SF3B1 und PUF60 allein, aber auch in Kooperation die Transkriptionseffizienz von MDMX beeinflussen können. Des Weiteren ist bekannt, dass PUF60 zusammen mit U2AF(65) das alternative Spleißen beeinflussen kann. Gemeinsam können diese Proteine die Assoziation von U2-snRNP zur mRNA erleichtern [Page-McCaw et al. 1999]. Darüber hinaus kann PUF60 das Spleißen von Introns mit labilen 3`-Spleißstellen vermitteln [Hastings et al. 2007]. Das Spleißen von Exon 6 der MDMX-mRNA findet aber an konservierten Spleißstellen statt, weshalb PUF60 bei MDMX funktionell anders agieren muss. Nach Reduktion eines der beiden Polypyrimidin-Trakt-Bindeproteine kann das Spleißen endogener Transkripte verändert werden [Hastings et al. 2007]. In OAW-42 Zellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es nach Knockdown von PUF60 zum verstärkten Exon 6 Skipping kam. Exon 6 Skipping trat ebenso, wie unter 4.1 beschrieben, nach Behandlung mit Cisplatin bzw. Camptothecin auf. PUF60 ist nach Behandlung der OAW-42 Zellen mit diesen Zytostatika vermindert exprimiert. Schlussfolgernd führt Stress zur Reduktion des Spleißproteins PUF60, was wiederum zum Spleißen des Exon 6 führt. In dieser Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass PUF60 direkt an MDMX binden kann und ein Knockdown von PUF60 *in vitro* ebenfalls zum Exon 6 Skipping führte (Abb. 7-1). Dies zeigt, dass Stress die Expression von Spleißfaktoren, wie PUF60, beeinflussen kann. Über eine veränderte Expression von

Spleißfaktoren kann das alternative Spleißen reguliert werden, was einen Zusammenhang zwischen Stress und Spleißen deutlich macht.

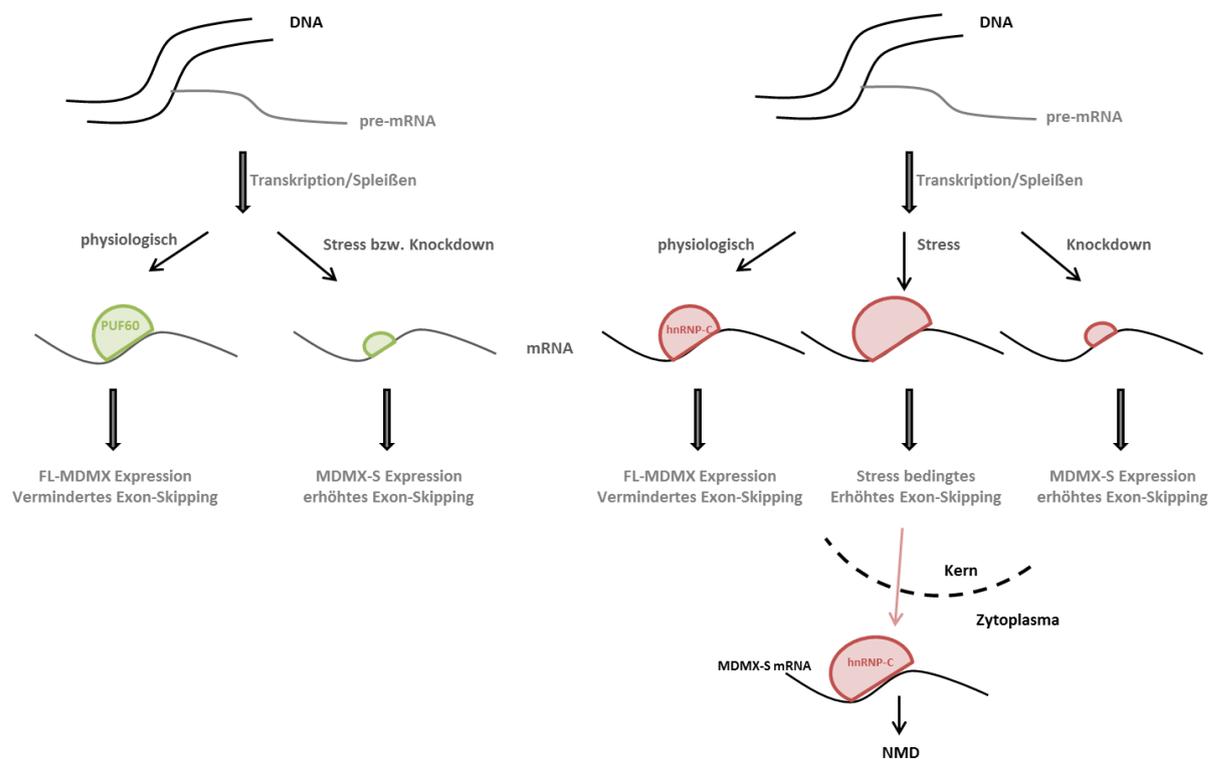


Abb. 7-1: Modell der Regulierung des Spleißens der MDMX-mRNA durch die Spleißfaktoren PUF60 (A) bzw. hnRNP-C (B)

Demgegenüber stehen die Ergebnisse der SKOV-3 Zellen. Hier zeigten sich nach Knockdown von PUF60 keine Veränderungen der MDMX-Expression bzw. im Spleißen der MDMX-mRNA. SKOV-3 Zellen (p53-null) unterscheiden sich sowohl im p53-Status, als auch in der Grundexpression der MDMX-S-mRNA von OAW-42 Zellen (wt-p53). SKOV-3-Zellen exprimieren bereits ohne Stressinduktion mehr MDMX-S als FL-MDMX. Auch nach Behandlung von SKOV-3 Zellen mit Cisplatin, wie unter 4.3.2 in Abb. 4-38 gezeigt, blieb die MDMX-S-mRNA weiterhin unverändert stark exprimiert. Des Weiteren ist bekannt, dass sich das Spleißen und der NMD gegenseitig beeinflussen [Gudikote et al. 2005]. In SKOV-3 Zellen ist vermutlich der NMD inhibiert, was eine Erklärung für die hohe Expression der MDMX-S-mRNA darstellt. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass durch die physiologisch geringe Konzentration von PUF60 in SKOV-3 Zellen, im Vergleich zu OAW-42 Zellen, die MDMX-S-mRNA verstärkt gebildet wird. Aus diesem Grund hätte der Knockdown von PUF60 in SKOV-3 Zellen keinen Effekt. In OAW-42 Zellen führte der Knockdown von PUF60 zum Exon 6 Skipping und zur

Verringerung der Transkriptionsrate von MDMX. SKOV-3 Zellen exprimieren im Vergleich zu OAW-42 Zellen nur wenig MDMX. Folgernd könnte PUF60 ein wichtiger Spleißfaktor zur Regulierung der MDMX-Transkription bzw. des Spleißens von Exon 6 bilden.

Das zweite Protein (hnRNP-C), das nach RNA-Pull-Down als direktes Bindeprotein von MDMX identifiziert wurde, konnte sowohl in OAW-42 Zellen, als auch in SKOV-3 Zellen endogen nachgewiesen werden. In OAW-42 Zellen konnte nach Transfektion mit siRNAs gegen hnRNP-C eine Reduktion von 80 % bzw. 60 % in SKOV-3 Zellen erzielt werden. Die Inhibierung der hnRNP-C-mRNA in SKOV-3 Zellen ergab auf mRNA-Ebene keine Beeinflussung der MDMX-Expression, jedoch auf Proteinebene. Hier zeigte sich eine Erhöhung des Proteinlevels und damit eine leichte Stabilisierung des FL-MDMX-Proteins nach Herunterregulation von hnRNP-C. Die Reduktion von hnRNP-C in OAW-42 Zellen führte, wie der Knockdown von PUF60, zur verminderten Expression von MDMX auf mRNA- und Proteinebene. Auch das Exon 6 wurde verstärkt gespleißt. Caputi et al. konnten bereits 1999 zeigen, dass hnRNPs Exon Skipping regulieren. Anhand der SMN1-mRNA konnte die Bedeutung von hnRNP-C als regulatorisches Protein beim Spleißen von Exon 7 deutlich gezeigt werden [Irimura et al. 2008]. Des Weiteren führte der Knockdown von hnRNP-A/B zum Exon 2 Skipping der HIV-1-mRNA. Dies zeigt, dass auch andere Vertreter der hnRNP-Familie Exon Skipping regulieren können. hnRNP-C konkurriert außerdem mit U2AF(65) um konservierte und labile Spleißstellen [Zarnack et al. 2013]. hnRNPs gehören ebenfalls zu den *trans-acting factors* und haben damit die Möglichkeit, Spleißenhancer und -silencer zu binden. Eine veränderte Expression, aber auch Lokalisation hat großen Einfluss auf das Spleißen einzelner Exone. Nach Stressinduktion ist hnRNP-C in OAW-42 Zellen verstärkt exprimiert. Somit sind eine Reduktion und ein Überangebot des Spleißproteins mit Exon 6 Skipping verbunden. hnRNP-C kann sich darüber hinaus zwischen Kern und Zytoplasma bewegen [Yang et al. 2013]. mRNAs werden für die Translation aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert. Da der NMD während der „Pioneer Round“ der Translation rekrutiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass die erhöhte Expression von hnRNP-C nach Stressinduktion für den Transport der MDMX-S-mRNA ins Zytoplasma benötigt wird. Andererseits konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass eine geringe Konzentration von hnRNP-C einen direkten Einfluss auf das Spleißen des Exon 6 hat (Abb. 7-1). Ein Anstieg von hnRNP-C konnte ebenfalls nach IR Bestrahlung in HepG2 Zellen detektiert werden, weshalb ein Zusammenhang mit dem Apoptose-Pathway postuliert wurde [Christian et al. 2008]. Zusammen-

genommen weisen die Daten auf eine Funktion von hnRNP-C in der Zellantwort auf einen DNA-Schaden hin.

5.4 Einfluss der Kinasen ATM und ATR beim Spleißen der MDMX-mRNA

DNA-Strang-Brüche setzen eine Proteinkaskade in Gang, die zum Zellzyklusarrest bzw. zur DNA-Reparatur führt. Können DNA-Brüche nicht mehr repariert werden, wird Apoptose durch Sensorproteine eingeleitet. Wichtige Sensorproteine sind ATM und ATR [Caporali et al. 2004]. Beide Kinasen können nach DNA-Schäden den Zellzyklusarrest induzieren [Abraham et al. 2001]. Hurley und Bunz (2007) konnten zeigen, dass der ATM- und der ATR-Signalweg nicht unabhängig voneinander sind. Ein Beispiel dafür wurde durch Stiff et al. (2006) beschrieben. Nach UV-Bestrahlung kommt es zu DNA-Doppelstrangbrüchen und der Aktivierung von ATR. Die DNA-Replikation wird inhibiert. ATR phosphoryliert ATM am Serin 1981, wodurch dieses aktiv wird. Infolgedessen sind in dieser Arbeit die Kinasen ATM und ATR gemeinsam betrachtet worden.

Sowohl durch die Inkubation der OAW-42 Zellen mit den ATM/ATR-Inhibitor CGK733 als auch durch Transfektion mit siRNAs gegen ATM und ATR konnte der ATM/ATR-Signalweg nach Stressinduktion (Cisplatin) gehemmt werden. Als Nachweis diente die verminderte Phosphorylierung des Chk1 am Serin 345, welches nach DNA-Schäden durch ATR phosphoryliert wird [Sorensen et al. 2003]. Eine verringerte Phosphorylierung von p53 am Serin 15 sowie eine verminderte Aktivierung von p21 wurden ebenfalls als Nachweis herangezogen. P53 wird unter Stressbedingungen am Serin 15 durch ATM phosphoryliert und p21 dadurch aktiviert [Giaggia et al. 1998]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der ATM/ATR-Signalweg das Spleißen der Exone 4 und 6 der MDMX-mRNA beeinflusst. In OAW-42 Zellen kam es nach Behandlung mit Cisplatin zum Exon Skipping. Die Inhibierung des ATM/ATR-Signalweges verminderte das Herausspleißen von Exon 4 und 6 nach DNA-Schäden (Cisplatin). Nach Behandlung der OAW-42 Zellen mit Cisplatin kam es darüber hinaus zum nahezu vollständigen Abbau des MDMX-Proteins. Der Abbau von MDMX kann durch Hemmung des ATM/ATR-Signalweges trotz Behandlung der Zellen mit Cisplatin verhindert werden. Die FL-MDMX-mRNA wird wieder stärker exprimiert, was eine Erklärung des Vorhandenseins des FL-MDMX-Proteins nach Inhibierung des ATM/ATR-Signalweges und zusätzlicher Cisplatin Behandlung darstellt. Dass genotoxischer Stress das Spleißen

beeinflusst, ist durch verschiedene Gruppen belegt. Bisher konnten aber nur wenige einen direkten Zusammenhang zwischen dem ATM/ATR-Signalweges und dem Spleißen einzelner Exone präsentieren. Katzenberger et al. (2006) zeigten mittels Knockdown von ATR bzw. ATM die Beeinflussung des Spleißens der TAF1-mRNA nach genotoxischem Stress (IR, Camptothecin). Nach IR-Bestrahlung kam es, nur in Abhängigkeit von aktiviertem ATM, zum Spleißen der Transkriptvariante 3 und 4 der TAF1-mRNA. Im Vergleich dazu entstanden die gleichen Varianten nach Camptothecin Behandlung nur, wenn ATR aktiviert war. Lents et al. (2008) charakterisierten ein Transkript der MDM2-mRNA nach Inkubation von NIH3T3 Zellen mit Adriamycin, welches im Intron 10 ein zusätzliches Exon bildet. Das Spleißen dieser um 108 nt vergrößerter MDM2-mRNA kann durch Inhibierung des ATM/ATR-Pathways mittels Koffein verhindert werden.

Nach Cisplatin Behandlung kommt es zu DNA-Strang-Brüchen, die zur Autophosphorylierung von ATM-Dimeren führen, wodurch die aktive monomere Form von ATM entsteht. Folglich kann MDMX am Serin 403 durch ATM direkt oder indirekt über Chk2 an den Serinresten 342 bzw. 367 phosphoryliert werden [Pereg et al. 2005, Chen et al. 2005]. Diese Markierungen am MDMX nahe der RING-Domäne werden von der E3-Ligase Funktion des MDM2-Proteins erkannt. Nach Ubiquitinylierung von MDMX wird es anschließend durch das Proteasom abgebaut [Marine und Jochemsen, 2005]. MDMX kann darüber hinaus auch unabhängig vom ATM nach DNA-Schäden für den proteasomalen Abbau markiert werden. C-Abl phosphoryliert MDMX am Tyrosin 99 inmitten der p53-Bindedomäne, was zur Stabilisierung von p53 und zum Abbau von MDMX führt [Zuckerman et al. 2009]. Dies stellt, trotz Inhibierung des ATM/ATR-Signalweges, eine weitere Erklärung des vorhandenen, aber geringen Abbaus von MDMX nach Cisplatin Behandlung dar.

Unter Berücksichtigung, dass genotoxischer Stress DNA-Schäden bedingt, die den ATM/ATR-Signalweg aktivieren, sollte das aberrante und alternative Spleißen nach genotoxischem Stress stärker in den Fokus von Untersuchungen treten. ATM und ATR stehen am Anfang der Signalkaskade nach einem DNA-Schaden. Nachfolgend gibt es weitere Proteine der Kaskade, wie Chk1 bzw. Chk2, die potentiell das Spleißen beeinflussen könnten. Diese, aber auch weitere Proteine, müssten in Bezug auf den Einfluss beim Spleißen nach genotoxischem Stress untersucht werden.

5.5 Einfluss von p53 beim Spleißen der MDMX-mRNA

Ein weiterer Vertreter *downstream* in der Signalkaskade von ATM und ATR nach genotoxischem Stress ist das Tumorsuppressorprotein p53. In OAW-42 Zellen (wt-p53), als auch in SKOV-3 Zellen (p53-null) wird MDMX nach Cisplatin Behandlung degradiert. Ein Knockdown von p53 in OAW-42 Zellen bzw. eine Überexpression von p53 in SKOV-3 Zellen ergaben nach Cisplatin Behandlung keine Veränderung der Expression des MDMX-Proteins. Folglich ist die Degradierung von MDMX nach DNA-Schäden p53 unabhängig, obwohl *in vivo* der Abbau von MDMX unter Stressbedingungen wichtig ist für die p53-vermittelte Antwort und die Tumorsuppression [Wang et al. 2009]. SKOV-3 Zellen exprimieren, im Vergleich zu OAW-42 Zellen, nur wenig FL-MDMX-Protein, was durch die erhöhte Grundexpression der MDMX-S-mRNA zu begründen ist. Kim et al. (2013) konnten zeigen, dass der Spleißfaktor hnRNP-Q die Translation von p53 unter normalen und Stressbedingungen regulieren kann. Dies zeigt, wie eng der Spleißmechanismus mit dem DNA-Damage-Pathway verknüpft ist.

Die mitunter wichtigste Funktion von p53 ist die Einleitung der Apoptose. P53 kann Apoptose direkt einleiten über die Wechselwirkung mit BclX oder indirekt über die Transkription von Genen, die in die Apoptose involviert sind [Vousden et al. 2002, Moll et al. 2005]. Zellen ohne wt-p53 haben Strategien entwickelt, auf Stress zu reagieren. Mutiertes p53 kann beispielsweise an den Transkriptionsfaktor NF-Y binden, der wiederum die Transkription einiger Gene des Zellzyklus reguliert [Di Agostino et al. 2006]. SKOV-3 Zellen zeigen nach Cisplatin Behandlung z.B. keine Aktivierung von p21. Nach Überexpression von p53 wird die Transkription von p21 aber initiiert. Als Folge einer Cisplatin Behandlung dieser Zellen wird p21 nicht mehr aktiviert, was auf eine veränderte Strategie von SKOV-3 Zellen nach DNA-Schäden hindeutet. Die Zellen gehen nicht in den Zellzyklusarrest, sondern vermutlich direkt in Apoptose. Deng et al. (1995) zeigten ebenfalls, dass embryonale Mausfibroblasten (p21^{-/-}) nach DNA-Schäden nicht in G1-Arrest übergehen. Darüber hinaus entwickelten Mäuse ohne p21^{CIP1/WAF1} keine spontanen Tumoren, was Apoptose als Schutz des Organismus nach Stress impliziert. Bei vorliegender Schädigung der DNA bedingt das Vorhandensein von wt-p53 u.a. die Möglichkeit die Transkription von Spleißfaktoren an- bzw. abzuschalten, was zur Regulation der Spleißmaschinerie führt.

In OAW-42 Zellen konnte nach Knockdown von p53 und Cisplatin Behandlung die Expression einer Transkriptvariante (MDMX-Alt2) vermehrt identifiziert werden. MDMX-Alt2 ist

charakterisiert durch die Deletion der Exone 4-9. Nach alleiniger Cisplatin Behandlung trat MDMX-Alt2 nur unterrepräsentiert auf. Am Beispiel dieser Variante kann die vermutete Beeinflussung von p53 beim Spleißen der MDMX-mRNA gefestigt werden. In SKOV-3 Zellen trat hingegen nach p53 Überexpression und Cisplatin Behandlung ein annähernd ausgeglichenes und somit verändertes Niveau von Transkripten mit und ohne Exon 6 auf. Folglich waren Transkripte mit Exon 6 leicht erhöht und Transkripte ohne Exon 6 leicht vermindert exprimiert. In beiden Fällen trat die Veränderung des Spleißens nur in Verbindung mit DNA-Schäden auf.

Diese Arbeit unterstreicht die bereits vorhandene Ansicht, dass der DNA-Damage-Pathway und die Spleißmaschinerie verknüpft sind. Die unterschiedliche Reaktion der wt-p53 Zelllinie OAW-42 und der p53-null Zelllinie SKOV-3 auf einen DNA-Schaden zeigt, dass DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest bzw. Apoptose in Abhängigkeit vom p53-Status der Zellen auch durch andere Transkriptionsfaktoren aktiviert werden können. Dementsprechend erfolgt nach einem DNA-Schaden nur in wt-p53 Zellen die p53-vermittelte Aktivierung von Zielgenen die das Spleißen beeinflussen. Hingegen wird wahrscheinlich in p53-null Zellen nach einem DNA-Schaden alternatives Spleißen der MDMX-mRNA über ein zu p53 funktionell homologes Protein ausgelöst.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von DNA-Schäden auf das Spleißen der MDMX-mRNA zu untersuchen. Die verwendeten Zytostatika (Cisplatin und Camptothecin) führten zum erhöhten Exon Skipping in OAW-42 Zellen. Dabei sind die Exone 6 und 9 bevorzugt gespleißt worden, weshalb ein erster Zusammenhang zwischen DNA-Schäden und alternativem Spleißen postuliert wurde. Die MDMX-S-mRNA, die durch Deletion von Exon 6 und des daraus resultierenden vorzeitigen Stoppkodons (PTC) charakterisiert ist, konnte nach DNA-Schäden vermehrt detektiert werden. Bei mRNAs mit PTC besteht die Möglichkeit des Abbaus durch den NMD. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die MDMX-S-mRNA ein Substrat des NMD ist. Da die MDMX-S-mRNA weiterhin eine wichtige Rolle in einigen Tumorarten spielt und auch in OAW-42 Zellen nach Behandlung mit beiden Zytostatika verstärkt exprimiert vorlag, sind Spleißproteine identifiziert worden, die am Spleißen des Exon 6 beteiligt sind. PUF60 und hnRNP-C sind Spleißfaktoren, die an die MDMX-S-mRNA binden und am Spleißen des Exon 6 beteiligt sind. In OAW-42 Zellen zeigten beide Spleißfaktoren nach Knockdown einen Anstieg von Transkripten ohne Exon 6. Daher konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von PUF60 bzw. hnRNP-C und dem Herauspleißen von Exon 6 festgestellt werden.

Weiterhin sind der Einfluss der Kinasen ATM und ATR, sowie von p53, auf das Spleißen der MDMX-mRNA untersucht worden. Alle drei Proteine sind Bestandteil des DNA-Damage-Pathways, von dem bekannt ist, dass dieser das Spleißen beeinflussen kann. Nach Knockdown der Kinasen und anschließender Cisplatin Behandlung trat Exon 6 Skipping vermindert auf. Unter diesen Bedingungen stieg der FL-MDMX-Proteinlevel wieder an, was durch erhöhte Exon 6 Insertion zu begründen ist. Die Effekte des Knockdowns von p53 in wt-p53 Zellen (OAW-42) wurden mit der Überexpression von p53 in p53-null Zellen (SKOV-3) verglichen. Beide Zelllinien wurden zusätzlich mit Cisplatin behandelt und wiesen eine geringe Änderung des Exon 6 Skipplings auf. Zusammengenommen lässt sich somit ein Einfluss sowohl der Kinasen als auch von wt-p53 beim Spleißen der MDMX-mRNA vermuten.

Um die Rolle von MDMX-S in Tumoren besser einschätzen zu können, sollten weitere Tumorarten auf dessen Expression hin überprüft werden. Des Weiteren wäre es von Vorteil, den MDMX-S-Status von Tumorproben vor und nach der Therapie zu bestimmen, da der MDMX-S-Level nach Zytostatika Behandlung in den OAW-42 Zellen anstieg. Dieser Anstieg

könnte durch Hemmung des NMD begründet sein, der durch die Therapie mit Zytostatika ausgelöst wird. Ein therapeutischer Ansatzpunkt ist die Verhinderung der Expression der MDMX-S-mRNA. Demzufolge müsste ein Weg gefunden werden die während einer Zytostatikatherapie ausgelöste Hemmung des NMD zu umgehen.

Der Spleißfaktor PUF60 zeigte nach Therapie (Cisplatin Behandlung) eine verringerte Expression und der gezielte Knockdown eine erhöhte MDMX-S-mRNA Expression. Folglich könnte ein Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau von PUF60 und dem Spleißen von Exon 6 bestehen. Um die Aussagekraft zu erhöhen, müssten weitere Zelllinien vergleichend zu OAW-42 Zellen überprüft werden. Diese Zelllinien sollten zur besseren Vergleichbarkeit wt-p53-Status besitzen und unter physiologischen Bedingungen, wie OAW-42 Zellen, weniger MDMX-S als FL-MDMX exprimieren. Des Weiteren müsste im Anschluss über ein statistisch relevantes Tumorkollektiv eine potentielle Korrelation zwischen p53-Status, MDMX-S-mRNA Expression und PUF60 überprüft werden.

Zusammengefasst zeigen die Daten deutliche Hinweise, dass durch DNA-Schäden, die aufgrund einer Zytostatika Behandlung entstehen, das Spleißen der MDMX-mRNA beeinflusst wird. Die Spleißvariante MDMX-S stand im Fokus der Untersuchungen, da die erhöhte Expression dieser Variante in einigen Tumorarten mit einem verkürzten Überleben korreliert. Demgemäß könnten die in dieser Arbeit ermittelten Daten wichtige Ansätze zur Optimierung der Therapie von Tumorpatienten sein.

7. Literaturverzeichnis

- Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15, 2177-2196.
- Allende-Vega, N., Dayal, S., Agarwala, U., Sparks, A., Bourdon, J.C., and Saville, M.K. (2013). p53 is activated in response to disruption of the pre-mRNA splicing machinery. *Oncogene* 32, 1-14.
- Anczukow, O., Rosenberg, A.Z., Akerman, M., Das, S., Zhan, L., Karni, R., Muthuswamy, S.K., and Krainer, A.R. (2012). The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nat Struct Mol Biol* 19, 220-228.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3, 421-429.
- Bartel, F., Schulz, J., Bohnke, A., Blumke, K., Kappler, M., Bache, M., Schmidt, H., Wurl, P., Taubert, H., and Hauptmann, S. (2005). Significance of HDMX-S (or MDM4) mRNA splice variant overexpression and HDMX gene amplification on primary soft tissue sarcoma prognosis. *Int J Cancer* 117, 469-475.
- Bhattacharya, S., Ray, R.M., and Johnson, L.R. (2009). Role of polyamines in p53-dependent apoptosis of intestinal epithelial cells. *Cell Signal* 21, 509-522.
- Biegging, K.T., and Attardi, L.D. (2012). Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression. *Trends Cell Biol* 22, 97-106.
- Blencowe, Exonic splicing enhancers_mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases, 2000.pdf.
- Brooks, S.A. (2010). Functional interactions between mRNA turnover and surveillance and the ubiquitin proteasome system. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 1, 240-252.
- Brown, E.J., and Baltimore, D. (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* 14, 397-402.
- Bruno, I.G., Karam, R., Huang, L., Bhardwaj, A., Lou, C.H., Shum, E.Y., Song, H.W., Corbett, M.A., Gifford, W.D., Gecz, J., Pfaff, S.L., and Wilkinson, M.F. (2011). Identification of a microRNA that activates gene expression by repressing nonsense-mediated RNA decay. *Mol Cell* 42, 500-510.
- Burset, M., Seledtsov, I.A., and Solovyev, V.V. (2000). Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res* 28, 4364-4375.
- Caporali, S., Falcinelli, S., Starace, G., Russo, M.T., Bonmassar, E., Jiricny, J., and D'atri, S. (2004). DNA damage induced by temozolomide signals to both ATM and ATR: role of the mismatch repair system. *Mol Pharmacol* 66, 478-491.
- Chandler, D.S., Singh, R.K., Caldwell, L.C., Bitler, J.L., and Lozano, G. (2006). Genotoxic stress induces coordinately regulated alternative splicing of the p53 modulators MDM2 and MDM4. *Cancer Res* 66, 9502-9508.

- Chang, Y.F., Imam, J.S., and Wilkinson, M.F. (2007). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* 76, 51-74.
- Chen, L., Yin, H., Farooqi, B., Sebt, S., Hamilton, A.D., and Chen, J. (2005). p53 alpha-Helix mimetics antagonize p53/MDM2 interaction and activate p53. *Mol Cancer Ther* 4, 1019-1025.
- Christian, K.J., Lang, M.A., and Raffalli-Mathieu, F. (2008). Interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 with a novel cis-regulatory element within p53 mRNA as a response to cytostatic drug treatment. *Mol Pharmacol* 73, 1558-1567.
- Ciarimboli, G., and Schlatter, E. (2005). Regulation of organic cation transport. *Pflugers Arch* 449, 423-441.
- Corsini, L., Hothorn, M., Stier, G., Rybin, V., Scheffzek, K., Gibson, T.J., and Sattler, M. (2009). Dimerization and protein binding specificity of the U2AF homology motif of the splicing factor Puf60. *J Biol Chem* 284, 630-639.
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 294, 1713-1716.
- Crichton, D., and Ryan, K.M. (2004). Splicing DNA-damage responses to tumour cell death. *Biochim Biophys Acta* 1705, 3-15.
- De Graaf, P., Little, N.A., Ramos, Y.F., Meulmeester, E., Letteboer, S.J., and Jochemsen, A.G. (2003). Hdmx protein stability is regulated by the ubiquitin ligase activity of Mdm2. *J Biol Chem* 278, 38315-38324.
- DeLeo, Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse, 1979.pdf.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., and Leder, P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675-684.
- Di Agostino, S., Strano, S., Emiliozzi, V., Zerbini, V., Mottolese, M., Sacchi, A., Blandino, G., and Piaggio, G. (2006). Gain of function of mutant p53: the mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation. *Cancer Cell* 10, 191-202.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.
- Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Pinol-Roma, S., and Burd, C.G. (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* 62, 289-321.
- Dutertre, M., Sanchez, G., De Cian, M.C., Barbier, J., Dardenne, E., Gratadou, L., Dujardin, G., Le Jossic-Corcoss, C., Corcoss, L., and Auboeuf, D. (2010). Cotranscriptional exon skipping in the genotoxic stress response. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1358-1366.
- El-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1, 45-49.

- Evans, S.C., Viswanathan, M., Grier, J.D., Narayana, M., El-Naggar, A.K., and Lozano, G. (2001). An alternatively spliced HDM2 product increases p53 activity by inhibiting HDM2. *Oncogene* 20, 4041-4049.
- Francoz, S., Froment, P., Bogaerts, S., De Clercq, S., Maetens, M., Doumont, G., Bellefroid, E., and Marine, J.C. (2006). Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3232-3237.
- Gavrilov, D.K., Shi, X., Das, K., Gilliam, T.C., and Wang, C.H. (1998). Differential SMN2 expression associated with SMA severity. *Nat Genet* 20, 230-231.
- Gehring, N.H., Neu-Yilik, G., Schell, T., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2003). Y14 and hUpf3b form an NMD-activating complex. *Mol Cell* 11, 939-949.
- Gembarska, A., Luciani, F., Fedele, C., Russell, E.A., Dewaele, M., Villar, S., Zwolinska, A., Haupt, S., De Lange, J., Yip, D., Goydos, J., Haigh, J.J., Haupt, Y., Larue, L., Jochemsen, A., Shi, H., Moriceau, G., Lo, R.S., Ghanem, G., Shackleton, M., Bernal, F., and Marine, J.C. (2012). MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat Med* 18, 1239-1247.
- Gilkes, D.M., Pan, Y., Coppola, D., Yeatman, T., Reuther, G.W., and Chen, J. (2008). Regulation of MDMX expression by mitogenic signaling. *Mol Cell Biol* 28, 1999-2010.
- Goldstein, M., Roos, W.P., and Kaina, B. (2008). Apoptotic death induced by the cyclophosphamide analogue mafosfamide in human lymphoblastoid cells: contribution of DNA replication, transcription inhibition and Chk/p53 signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* 229, 20-32.
- Gu, J., Kawai, H., Nie, L., Kitao, H., Wiederschain, D., Jochemsen, A.G., Parant, J., Lozano, G., and Yuan, Z.M. (2002). Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53. *J Biol Chem* 277, 19251-19254.
- Gudikote, J.P., Imam, J.S., Garcia, R.F., and Wilkinson, M.F. (2005). RNA splicing promotes translation and RNA surveillance. *Nat Struct Mol Biol* 12, 801-809.
- Hainaut, P., Hall, A., and Milner, J. (1994). Analysis of p53 quaternary structure in relation to sequence-specific DNA binding. *Oncogene* 9, 299-303.
- Haley, B., Paunesku, T., Protic, M., and Woloschak, G.E. (2009). Response of heterogeneous ribonuclear proteins (hnRNP) to ionising radiation and their involvement in DNA damage repair. *Int J Radiat Biol* 85, 643-655.
- Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28, 739-745.
- Harrison, J.C., and Haber, J.E. (2006). Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet* 40, 209-235.
- Hastings, M.L., Allemand, E., Duelli, D.M., Myers, M.P., and Krainer, A.R. (2007). Control of pre-mRNA splicing by the general splicing factors PUF60 and U2AF(65). *PLoS One* 2, e538.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.

- He, X., Pool, M., Darcy, K.M., Lim, S.B., Auersperg, N., Coon, J.S., and Beck, W.T. (2007). Knockdown of polypyrimidine tract-binding protein suppresses ovarian tumor cell growth and invasiveness in vitro. *Oncogene* 26, 4961-4968.
- Huang, L., Yan, Z., Liao, X., Li, Y., Yang, J., Wang, Z.G., Zuo, Y., Kawai, H., Shadfai, M., Ganapathy, S., and Yuan, Z.M. (2011). The p53 inhibitors MDM2/MDMX complex is required for control of p53 activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12001-12006.
- Huang, Y., Gattoni, R., Stevenin, J., and Steitz, J.A. (2003). SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Mol Cell* 11, 837-843.
- Hurley, P.J., and Bunz, F. (2007). ATM and ATR: components of an integrated circuit. *Cell Cycle* 6, 414-417.
- Ishida, S., Lee, J., Thiele, D.J., and Herskowitz, I. (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14298-14302.
- Itahana, K., Mao, H., Jin, A., Itahana, Y., Clegg, H.V., Lindstrom, M.S., Bhat, K.P., Godfrey, V.L., Evan, G.I., and Zhang, Y. (2007). Targeted inactivation of Mdm2 RING finger E3 ubiquitin ligase activity in the mouse reveals mechanistic insights into p53 regulation. *Cancer Cell* 12, 355-366.
- Jackson, I.J. (1991). A reappraisal of non-consensus mRNA splice sites. *Nucleic Acids Res* 19, 3795-3798.
- Jackson, J.G., Post, S.M., and Lozano, G. (2011). Regulation of tissue- and stimulus-specific cell fate decisions by p53 in vivo. *J Pathol* 223, 127-136.
- Jamieson, E.R., and Lippard, S.J. (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev* 99, 2467-2498.
- Jurica, M.S., and Moore, M.J. (2003). Pre-mRNA splicing: a wash in a sea of proteins. *Mol Cell* 12, 5-14.
- Kafasla, P., Mickleburgh, I., Llorian, M., Coelho, M., Gooding, C., Cherny, D., Joshi, A., Kotik-Kogan, O., Curry, S., Eperon, I.C., Jackson, R.J., and Smith, C.W. (2012). Defining the roles and interactions of PTB. *Biochem Soc Trans* 40, 815-820.
- Karam, R., Carvalho, J., Bruno, I., Graziadio, C., Senz, J., Huntsman, D., Carneiro, F., Seruca, R., Wilkinson, M.F., and Oliveira, C. (2008). The NMD mRNA surveillance pathway downregulates aberrant E-cadherin transcripts in gastric cancer cells and in CDH1 mutation carriers. *Oncogene* 27, 4255-4260.
- Karam, R., Wengrod, J., Gardner, L.B., and Wilkinson, M.F. (2013). Regulation of nonsense-mediated mRNA decay: implications for physiology and disease. *Biochim Biophys Acta* 1829, 624-633.
- Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., and Ohno, S. (2006). Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 20, 355-367.

- Katzenberger, R.J., Marengo, M.S., and Wassarman, D.A. (2006). ATM and ATR pathways signal alternative splicing of *Drosophila* TAF1 pre-mRNA in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 26, 9256-9267.
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7, 573-584.
- Kim, D.Y., Kim, W., Lee, K.H., Kim, S.H., Lee, H.R., Kim, H.J., Jung, Y., Choi, J.H., and Kim, K.T. (2013). hnRNP Q regulates translation of p53 in normal and stress conditions. *Cell Death Differ* 20, 226-234.
- Konig, J., Zarnack, K., Rot, G., Curk, T., Kayikci, M., Zupan, B., Turner, D.J., Luscombe, N.M., and Ule, J. (2010). iCLIP reveals the function of hnRNP particles in splicing at individual nucleotide resolution. *Nat Struct Mol Biol* 17, 909-915.
- Kornblihtt, A.R., Schor, I.E., Allo, M., Dujardin, G., Petrillo, E., and Munoz, M.J. (2013). Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 153-165.
- Krecic, A.M., and Swanson, M.S. (1999). hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol* 11, 363-371.
- Kuroha, K., Tatematsu, T., and Inada, T. (2009). Upf1 stimulates degradation of the product derived from aberrant messenger RNA containing a specific nonsense mutation by the proteasome. *EMBO Rep* 10, 1265-1271.
- Lakin, N.D., and Jackson, S.P. (1999). Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 18, 7644-7655.
- Lane, D.P. (1992). Worrying about p53. *Curr Biol* 2, 581-583.
- Lang, G.A., Iwakuma, T., Suh, Y.A., Liu, G., Rao, V.A., Parant, J.M., Valentin-Vega, Y.A., Terzian, T., Caldwell, L.C., Strong, L.C., El-Naggar, A.K., and Lozano, G. (2004). Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 119, 861-872.
- Lavin, M.F., and Kozlov, S. (2007). ATM activation and DNA damage response. *Cell Cycle* 6, 931-942.
- Lazzaro, F., Giannattasio, M., Puddu, F., Granata, M., Pellicoli, A., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M. (2009). Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair. *DNA Repair (Amst)* 8, 1055-1067.
- Lee, E.K., Kim, H.H., Kuwano, Y., Abdelmohsen, K., Srikantan, S., Subaran, S.S., Gleichmann, M., Mughal, M.R., Martindale, J.L., Yang, X., Worley, P.F., Mattson, M.P., and Gorospe, M. (2010). hnRNP C promotes APP translation by competing with FMRP for APP mRNA recruitment to P bodies. *Nat Struct Mol Biol* 17, 732-739.
- Lenos, K., Grawenda, A.M., Lodder, K., Kuijjer, M.L., Teunisse, A.F., Repapi, E., Grochola, L.F., Bartel, F., Hogendoorn, P.C., Wuerl, P., Taubert, H., Cleton-Jansen, A.M., Bond, G.L., and Jochemsen, A.G. (2012). Alternate splicing of the p53 inhibitor HDMX offers a superior prognostic biomarker than p53 mutation in human cancer. *Cancer Res* 72, 4074-4084.
- Lenos, K., and Jochemsen, A.G. (2011). Functions of MDMX in the modulation of the p53-response. *J Biomed Biotechnol* 2011, 876173.

- Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Li, M., and Gu, W. (2011). A critical role for noncoding 5S rRNA in regulating Mdmx stability. *Mol Cell* 43, 1023-1032.
- Lin, C.P., Choi, Y.J., Hicks, G.G., and He, L. (2012). The emerging functions of the p53-miRNA network in stem cell biology. *Cell Cycle* 11, 2063-2072.
- Linares, L.K., Hengstermann, A., Ciechanover, A., Muller, S., and Scheffner, M. (2003). HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12009-12014.
- Linzer and Levine, Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells, 1979.pdf.
- Listerman, I., Sapra, A.K., and Neugebauer, K.M. (2006). Cotranscriptional coupling of splicing factor recruitment and precursor messenger RNA splicing in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 13, 815-822.
- Liu, L., Fan, L., Fang, C., Zou, Z.J., Yang, S., Zhang, L.N., Li, J.Y., and Xu, W. (2012). S-MDM4 mRNA overexpression indicates a poor prognosis and marks a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Sci* 103, 2056-2063.
- Lujambio, A., and Lowe, S.W. (2012). The microcosmos of cancer. *Nature* 482, 347-355.
- Mandke, P., Wyatt, N., Fraser, J., Bates, B., Berberich, S.J., and Markey, M.P. (2012). MicroRNA-34a modulates MDM4 expression via a target site in the open reading frame. *PLoS One* 7, e42034.
- Maquat, L.E. (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 89-99.
- Maquat, L.E., Tarn, W.Y., and Isken, O. (2010). The pioneer round of translation: features and functions. *Cell* 142, 368-374.
- Marine, J.C., and Jochemsen, A.G. (2005). Mdmx as an essential regulator of p53 activity. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 750-760.
- Markey, M., and Berberich, S.J. (2008). Full-length hdmX transcripts decrease following genotoxic stress. *Oncogene* 27, 6657-6666.
- Mattick, J.S. (2003). The human genome and the future of medicine. *Med J Aust* 179, 212-216.
- Medghalchi, S.M., Frischmeyer, P.A., Mendell, J.T., Kelly, A.G., Lawler, A.M., and Dietz, H.C. (2001). Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability. *Hum Mol Genet* 10, 99-105.
- Meek, D.W., and Hupp, T.R. (2010). The regulation of MDM2 by multisite phosphorylation--opportunities for molecular-based intervention to target tumours? *Semin Cancer Biol* 20, 19-28.

- Mendell, J.T., Ap Rhys, C.M., and Dietz, H.C. (2002). Separable roles for rent1/hUpf1 in altered splicing and decay of nonsense transcripts. *Science* 298, 419-422.
- Mendell, J.T., Sharifi, N.A., Meyers, J.L., Martinez-Murillo, F., and Dietz, H.C. (2004). Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat Genet* 36, 1073-1078.
- Midgley, C.A., Desterro, J.M., Saville, M.K., Howard, S., Sparks, A., Hay, R.T., and Lane, D.P. (2000). An N-terminal p14ARF peptide blocks Mdm2-dependent ubiquitination in vitro and can activate p53 in vivo. *Oncogene* 19, 2312-2323.
- Migliorini, D., Danovi, D., Colombo, E., Carbone, R., Pelicci, P.G., and Marine, J.C. (2002). Hdmx recruitment into the nucleus by Hdm2 is essential for its ability to regulate p53 stability and transactivation. *J Biol Chem* 277, 7318-7323.
- Moll, U.M., Wolff, S., Speidel, D., and Deppert, W. (2005). Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* 17, 631-636.
- Munoz, M.J., Perez Santangelo, M.S., Paronetto, M.P., De La Mata, M., Pelisch, F., Boireau, S., Glover-Cutter, K., Ben-Dov, C., Blaustein, M., Lozano, J.J., Bird, G., Bentley, D., Bertrand, E., and Kornblihtt, A.R. (2009). DNA damage regulates alternative splicing through inhibition of RNA polymerase II elongation. *Cell* 137, 708-720.
- Neu-Yilik, G., and Kulozik, A.E. (2008). NMD: multitasking between mRNA surveillance and modulation of gene expression. *Adv Genet* 62, 185-243.
- Ohrmalm, C., and Akusjarvi, G. (2006). Cellular splicing and transcription regulatory protein p32 represses adenovirus major late transcription and causes hyperphosphorylation of RNA polymerase II. *J Virol* 80, 5010-5020.
- Page-Mccaw, P.S., Amonlirdviman, K., and Sharp, P.A. (1999). PUF60: a novel U2AF65-related splicing activity. *RNA* 5, 1548-1560.
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., and Blencowe, B.J. (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* 40, 1413-1415.
- Pant, V., Xiong, S., Iwakuma, T., Quintas-Cardama, A., and Lozano, G. (2011). Heterodimerization of Mdm2 and Mdm4 is critical for regulating p53 activity during embryogenesis but dispensable for p53 and Mdm2 stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11995-12000.
- Parant, J.M., Reinke, V., Mims, B., and Lozano, G. (2001). Organization, expression, and localization of the murine mdmx gene and pseudogene. *Gene* 270, 277-283.
- Parker, R., and Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25, 635-646.
- Pereg, Y., Lam, S., Teunisse, A., Biton, S., Meulmeester, E., Mittelman, L., Buscemi, G., Okamoto, K., Taya, Y., Shiloh, Y., and Jochemsen, A.G. (2006). Differential roles of ATM- and Chk2-mediated phosphorylations of Hdmx in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 26, 6819-6831.

- Perrin-Vidoz, L., Sinilnikova, O.M., Stoppa-Lyonnet, D., Lenoir, G.M., and Mazoyer, S. (2002). The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Hum Mol Genet* 11, 2805-2814.
- Phillips, A., Teunisse, A., Lam, S., Lodder, K., Darley, M., Emaduddin, M., Wolf, A., Richter, J., De Lange, J., Verlaan-De Vries, M., Lenos, K., Bohnke, A., Bartel, F., Blaydes, J.P., and Jochemsen, A.G. (2010). HDMX-L is expressed from a functional p53-responsive promoter in the first intron of the HDMX gene and participates in an autoregulatory feedback loop to control p53 activity. *J Biol Chem* 285, 29111-29127.
- Prodosmo, A., Giglio, S., Moretti, S., Mancini, F., Barbi, F., Avenia, N., Di Conza, G., Schunemann, H.J., Pistola, L., Ludovini, V., Sacchi, A., Pontecorvi, A., Puxeddu, E., and Moretti, F. (2008). Analysis of human MDM4 variants in papillary thyroid carcinomas reveals new potential markers of cancer properties. *J Mol Med (Berl)* 86, 585-596.
- Rallapalli, R., Strachan, G., Cho, B., Mercer, W.E., and Hall, D.J. (1999). A novel MDMX transcript expressed in a variety of transformed cell lines encodes a truncated protein with potent p53 repressive activity. *J Biol Chem* 274, 8299-8308.
- Ramos, Y.F., Stad, R., Attema, J., Peltenburg, L.T., Van Der Eb, A.J., and Jochemsen, A.G. (2001). Aberrant expression of HDMX proteins in tumor cells correlates with wild-type p53. *Cancer Res* 61, 1839-1842.
- Rogakou, E.P., and Sekeri-Pataryas, K.E. (1999). Histone variants of H2A and H3 families are regulated during in vitro aging in the same manner as during differentiation. *Exp Gerontol* 34, 741-754.
- Sakamuro, D., Sabbatini, P., White, E., and Prendergast, G.C. (1997). The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* 15, 887-898.
- Saltzman, A.L., Kim, Y.K., Pan, Q., Fagnani, M.M., Maquat, L.E., and Blencowe, B.J. (2008). Regulation of multiple core spliceosomal proteins by alternative splicing-coupled nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol* 28, 4320-4330.
- Sanford, J.R., Gray, N.K., Beckmann, K., and Caceres, J.F. (2004). A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes Dev* 18, 755-768.
- Schoenberg, D.R., and Maquat, L.E. (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* 13, 246-259.
- Sharp, D.A., Kratowicz, S.A., Sank, M.J., and George, D.L. (1999). Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. *J Biol Chem* 274, 38189-38196.
- Shomron, N., Alberstein, M., Reznik, M., and Ast, G. (2005). Stress alters the subcellular distribution of hSlu7 and thus modulates alternative splicing. *J Cell Sci* 118, 1151-1159.
- Shvarts, A., Steegenga, W.T., Riteco, N., Van Laar, T., Dekker, P., Bazuine, M., Van Ham, R.C., Van Der Houven Van Oordt, W., Hateboer, G., Van Der Eb, A.J., and Jochemsen, A.G. (1996). MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *EMBO J* 15, 5349-5357.
- Sigal, A., and Rotter, V. (2000). Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 60, 6788-6793.

- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731-745.
- Sorensen, C.S., Syljuasen, R.G., Falck, J., Schroeder, T., Ronnstrand, L., Khanna, K.K., Zhou, B.B., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 3, 247-258.
- Stiff, T., Walker, S.A., Cerosaletti, K., Goodarzi, A.A., Petermann, E., Concannon, P., O'driscoll, M., and Jeggo, P.A. (2006). ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J* 25, 5775-5782.
- Stolting, D.P., Koch, M., Wiese, M., Royer, H.D., and Bendas, G. (2014). Liposomal cisplatin can overcome chemotherapy resistance of A2780 ovarian cancer cells by inducing the extrinsic apoptotic pathway. *Int J Clin Pharmacol Ther* 52, 78-81.
- Strano, S., Dell'orso, S., Di Agostino, S., Fontemaggi, G., Sacchi, A., and Blandino, G. (2007). Mutant p53: an oncogenic transcription factor. *Oncogene* 26, 2212-2219.
- Syljuasen, R.G., Sorensen, C.S., Hansen, L.T., Fugger, K., Lundin, C., Johansson, F., Helleday, T., Sehested, M., Lukas, J., and Bartek, J. (2005). Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol* 25, 3553-3562.
- Tanimura, S., Ohtsuka, S., Mitsui, K., Shirouzu, K., Yoshimura, A., and Ohtsubo, M. (1999). MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains. *FEBS Lett* 447, 5-9.
- Terzian, T., Wang, Y., Van Pelt, C.S., Box, N.F., Travis, E.L., and Lozano, G. (2007). Haploinsufficiency of Mdm2 and Mdm4 in tumorigenesis and development. *Mol Cell Biol* 27, 5479-5485.
- Toledo, F., and Wahl, G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6, 909-923.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., and Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* 22, 5612-5621.
- Vitte, J., Fassier, C., Tiziano, F.D., Dalard, C., Soave, S., Roblot, N., Brahe, C., Saugier-veber, P., Bonnefont, J.P., and Melki, J. (2007). Refined characterization of the expression and stability of the SMN gene products. *Am J Pathol* 171, 1269-1280.
- Vousden, K.H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2, 594-604.
- Wade, M., Li, Y.C., and Wahl, G.M. (2013). MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 13, 83-96.
- Wang, X. (2011). p53 regulation: teamwork between RING domains of Mdm2 and MdmX. *Cell Cycle* 10, 4225-4229.
- Wang, X., and Jiang, X. (2012). Mdm2 and MdmX partner to regulate p53. *FEBS Lett* 586, 1390-1396.

- Wang, Y.V., Wade, M., and Wahl, G.M. (2009). Guarding the guardian: Mdmx plays important roles in setting p53 basal activity and determining biological responses in vivo. *Cell Cycle* 8, 3443-3444.
- Wilkinson, M.F. (2003). The cycle of nonsense. *Mol Cell* 12, 1059-1061.
- Will, C.L., Urlaub, H., Achsel, T., Gentzel, M., Wilm, M., and Luhrmann, R. (2002). Characterization of novel SF3b and 17S U2 snRNP proteins, including a human Prp5p homologue and an SF3b DEAD-box protein. *EMBO J* 21, 4978-4988.
- Wirth, B. (2002). Spinal muscular atrophy: state-of-the-art and therapeutic perspectives. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 3, 87-95.
- Wollerton, M.C., Gooding, C., Wagner, E.J., Garcia-Blanco, M.A., and Smith, C.W. (2004). Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay. *Mol Cell* 13, 91-100.
- Xiong, S., Van Pelt, C.S., Elizondo-Fraire, A.C., Liu, G., and Lozano, G. (2006). Synergistic roles of Mdm2 and Mdm4 for p53 inhibition in central nervous system development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3226-3231.
- Xu, Y., Ashley, T., Brainerd, E.E., Bronson, R.T., Meyn, M.S., and Baltimore, D. (1996). Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev* 10, 2411-2422.
- Yang, F., Yi, F., Han, X., Du, Q., and Liang, Z. (2013). MALAT-1 interacts with hnRNP C in cell cycle regulation. *FEBS Lett* 587, 3175-3181.
- Yeo, G.W., Van Nostrand, E.L., and Liang, T.Y. (2007). Discovery and analysis of evolutionarily conserved intronic splicing regulatory elements. *PLoS Genet* 3, e85.
- Zarnack, K., Konig, J., Tajnik, M., Martincorena, I., Eustermann, S., Stevant, I., Reyes, A., Anders, S., Luscombe, N.M., and Ule, J. (2013). Direct competition between hnRNP C and U2AF65 protects the transcriptome from the exonization of Alu elements. *Cell* 152, 453-466.
- Zhang, Z., and Krainer, A.R. (2004). Involvement of SR proteins in mRNA surveillance. *Mol Cell* 16, 597-607.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
tetradest.	tetradestilliertes Wasser
bp	Basenpaar
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	komplementäre DNA
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EJC	Exon-junction-complex
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	fötales Kälberserum
FL	Full-Length
g	Gramm
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
kDa	Kilodalton
LB	Bakteriennährmedium
M	Molar
m	milli
min	Minute
mRNA	„messenger RNA“, Boten-Ribonukleinsäure
mt	mutiert
n	nano
NMD	Nonsense-mediated mRNA decay

OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PTC	<u>P</u> remature <u>T</u> ermination <u>C</u> odon, vorzeitiges Stoppkodon
PVDF	Polyvinylidifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rotations per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	sense
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
U	Unit(s)
ÜN	über Nacht
V	Volt
wt	Wild-Typ
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indoyl- β -D-galaktosid
μ	Mikro (10^{-6})

8.2 MDMX-mRNA Sequenz (2554 bp)

1 GGGAGGCCGGAAGTTGCGGCTTCATTA CTGCCATTTCAA AATGCTGCCGAGGCCCTAGG
 61 ATCTGTGACTGCCACCCCTCCCCCACCCGGGCTCGGCGGGGAGCGACTCATGGAGCTG
 121 CCGTAAGTTTTACCAACAGACTGCAGTTTCTTCACTACCAAAA**TG**ACATCATTTTTCCACC
 181 TCTGCTCAGTGTTCAACATCTGACAGTGCTTGCAGGATCTCTCCTGGACAAATCAATCAG
 241 GTACGACCAAAACTGCCGCTTTTGAAGATTTTGCATGCAGCAGGTGCGCAAGGTGAAATG
 301 TTCACTGTAAAGAGGTCATGCACTATTTAGGTCAGTACATAATGGTGAAGCAACTTTAT
 361 GATCAGCAGGAGCAGCATATGGTATATTGTGGTGGAGATCTTTTGGGAGAACTACTGGGA
 421 CGTCAGAGCTTCTCCGTGAAAGACCCAAGCCCTCTCTATGATATGCTAAGAAAGAATCTT
 481 GTCACTTTAGCCACTGCTACTACAGATGCTGCTCAGACTCTCGCTCTCGCACAGGATCAC
 541 AGTATGGATATTCCAAGTCAAGACCAACTGAAGCAAAGTGCAGAGGAAAGTTCCACTTCC
 601 AGAAAAAGAACTACAGAAGACGATATCCCCACACTGCCTACCTCAGAGCATAAATGCATA
 661 CATTCTAGAGAAGATGAAGACTTAATTGAAAATTTAGCCCAAGATGAAACATCTAGGCTG
 721 GACCTTGGATTTGAGGAGTGGGATGTAGCTGGCCTGCCTTGGTGGTTTTTAGGAACTTG
 781 AGAAGCAACTATACACCTAGAAGTAATGGCTCAACTGATTTACAGACAAATCAGGATGTG
 841 GGTACTGCCATTGTTTCAGATACTACAGATGACTTGTGGTTTTTGAATGAGTCAGTATCA
 901 GAGCAGTTAGGTGTTGGAATAAAAGTTGAAGCTGCTGATACTGAACAAACAAGTGAAGAA
 961 GTAGGGAAAGTAAGTGACAAAAGGTGATTGAAGTGGGAAAAAATGATGACCTGGAGGAC
 1021 TCTAAGTCCTTAAGTGATGATACCGATGTAGAGGTTACCTCTGAGGATGAGTGGCAGTGT
 1081 ACTGAATGCAAGAAATTTAACTCTCCAAGCAAGAGGTA CTGTTTTCGTTGTTGGCCTTG
 1141 AGGAAGGATTGGTATTCAGATTGTTCAAAGTTAACCATTCTCTCTCCACGTCTGATATC
 1201 ACTGCCATACCTGAAAAGGAAAATGAAGGAAATGATGTCCCTGATTGTGGAAGAACCATT
 1261 TCGGCTCCTGTCGTTAGACCTAAAGATGCGTATATAAAGAAAGAAA ACTCCAACTTTTT
 1321 GATCCCTGCAACTCAGTGGAAATTCTTGGATTTGGCTCACAGTTCTGAAAGCCAAGAGACC
 1381 ATCTCAAGCATGGGAGAACAGTTAGATAACCTTTCTGAACAGAGAACAGATACAGAAAAC
 1441 ATGGAGGATTGCCAGAATCTCTTGAAGCCATGTAGCTTATGTGAGAAAAGACCACGAGAC
 1501 GGGAACATTATTCATGGAAGGACGGGCCATCTTGCTCACTTGT TTTCACTGTGCCAGAAGA
 1561 CTAAGAAGGCTGGGGCTTCATGCCCTATTTGCAAGAAAGAGATTCAGCTGGTTATTAAG
 1621 GTTTTTATAGCATA**A**TGGTAGTACGAACATAAAAATGCATTTATTCCGTTCACTTACCAC

1681 ATTATTTGAAAATCAATCCTTTATTTAATTTTATTTCCAACCTGTCAGAGAATGTTCTTA
 1741 GGCATCAAAATCCAAGGTAGCTGTAAGAAAAATACTGGAGCTAACAATGAAGAACAGAAG
 1801 TAATCTGATTAGTCAAATTATTAAGTGCCATGGATTACTTTATGCAGCAGTCAGGTACAT
 1861 AGTTAGGTGAACCCAAAAGAAAACTCTTGAAAACAAGAGATTTCTTCCATGCACATTTA
 1921 CAATATTGAGGTATAATTAACATGATAAAGTGTTTCCTTCTAACGAGTTGTAGAAATCTG
 1981 AGTAACCACCCAAAAAGCAATAGAATGTTTCTGTCACCCAAAAACACTCCCTTCTGCCC
 2041 CTCTTCAGACAGTCCTTCAGCTATTTTCATGGCTCTCACCTAGTTTTTTTTTTTTTTGCA
 2101 CTTTTTTTTTTTTCCGGGGGTATAGGGGAGGTGTGGGGCGACAGGGTCTGTCTTGTTCTGT
 2161 CTCCCAGGCTGAAGTGCAGTGCAGTGGTATGATCATGGCTCACTGCAGCCTTGGTTTCCT
 2221 GGGCATAAGTGGTCTTCCCACTTCAGCCTCCTGAGTAGCTGAGACTATAGACTAGCATAA
 2281 CCACACTGGCTAATTTTTTGTGGAGATGAAGTCTCACTATGTTGCCAGGCTGGTCTCGA
 2341 ACTCCTGGGCTCAAACAATCCTCCCGCCTCAGCCTTCCAAATTGCTGGGATTATAGTCAT
 2401 GAGGCACCTAGTCTGGCCCTTTTGCAAGACTTTAATCTGAAATCTAAATTTTTAAAATTT
 2461 AAGTACTTACAAAGGATATACTATCCAACATATTGCATATTATATATGTGCTTTTAAAGT
 2521 TTTTTTTTTTTTTTTGAGAGACGGTCTCACTTTG

Startkodon (ATG) bei Nukleotid 163

Stoppkodon (TAA) bei Nukleotid 1633

Exon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
mRNA	1-...	128-...	244-...	317-...	450-...	506-...	574-...	674-...	836-...	986-...	1067-...

8.3 Gensequenzen von MDMX

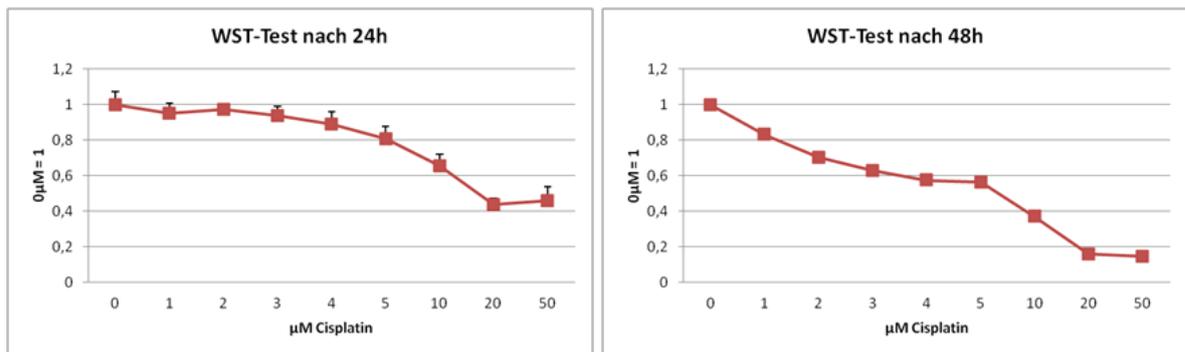
Human: NG_029367.1

Maus: ID: 17248

8.4 WST-Test von Cisplatin und Camptothecin

Zur Bestimmung einer geeigneten Konzentration zur Behandlung der OAW-42 Zellen mit Cisplatin (CPL) bzw. Camptothecin (CPT) wurde sich auf den LD₅₀-Wert bezogen. Dieser ist mittels WST-1-Test bestimmt worden. Die ermittelte Konzentration lag für Cisplatin nach 24 h bei 20 µM und nach 48 h bei 7 µM. Für Camptothecin betrug der LD₅₀-Wert nach 24 h 2 µM und nach 48 h 0,5 µM.

A



B

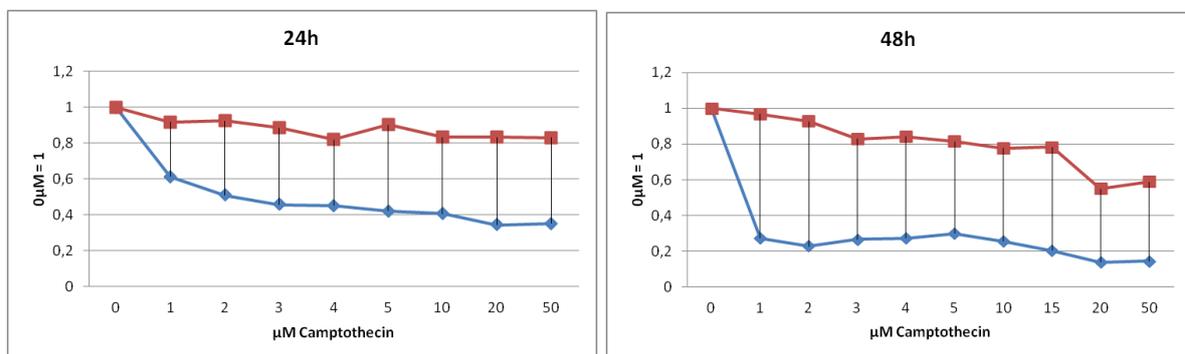
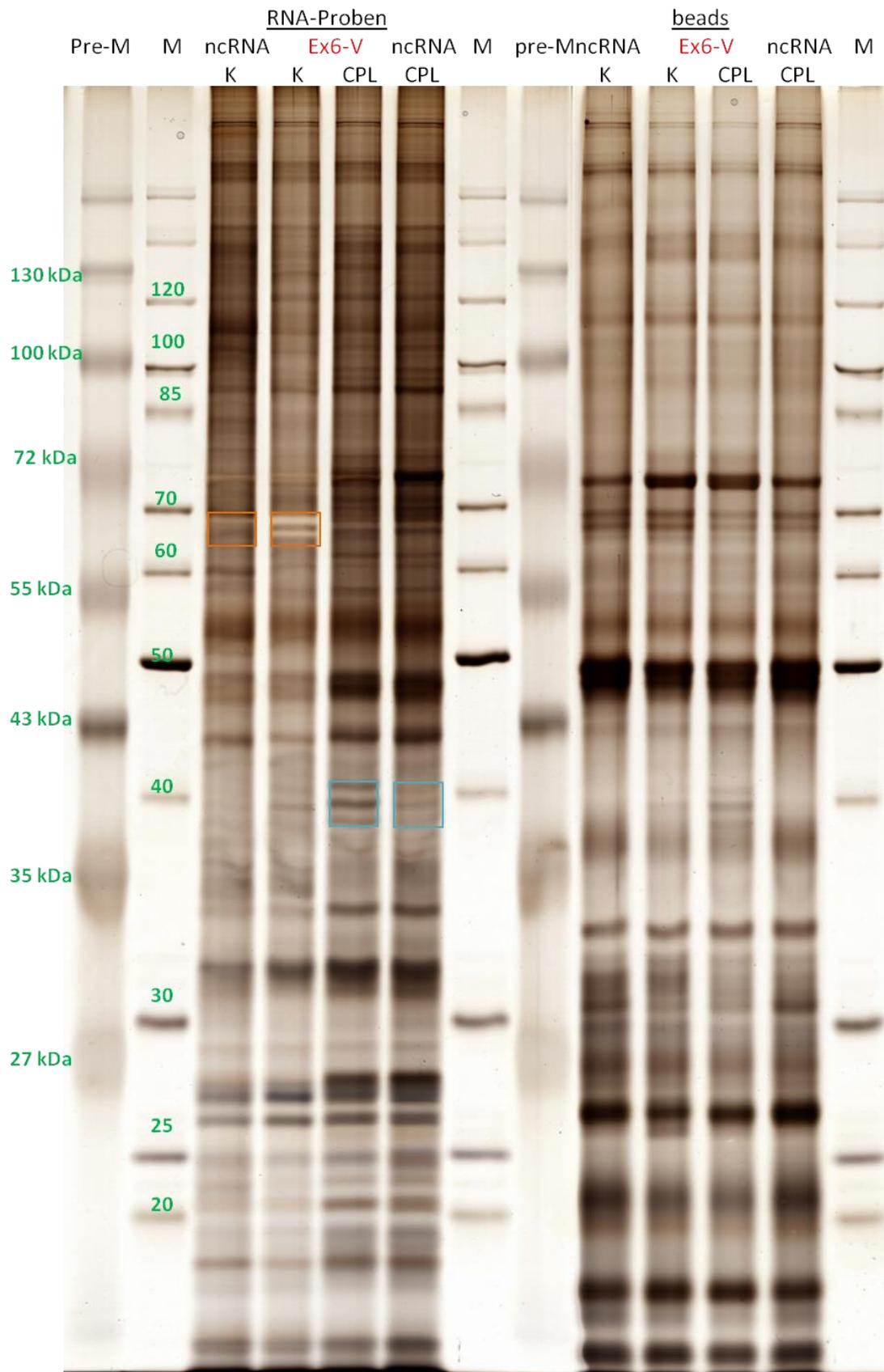


Abb. 10-1: Ermittlung des LD₅₀-Wertes von Cisplatin bzw. Camptothecin mittels WST-1-Reagenz

Dargestellt sind die Extinktionen bei 434 nm nach 24 und 48 Stunden Behandlung mit Cisplatin (A) bzw. Camptothecin (B, Blaue Kurve) und dessen Lösungsmittel Chloroform/Methanol (LM, rote Kurve)). Das Lösungsmittel wurde im gleichen Volumen eingesetzt, welches benötigt wurde um die entsprechende CPT-Konzentration zu erhalten.

8.5 Silbergefärbtes Gel nach RNA-Pull-Down (Ausschnitt siehe Abb. 4-17)



8.6 Proteinlisten der massenspektrometrischen Analyse (Ex6-V = Exon 6-Fragment)

ncRNA mit Proteinlysate aus unbehandelten OAW-42 Zellen						
Hit No.	Accession No.	Protein Description	Score	Mass [Da]	Matches	Coverage [%]
20	gi 117938307	doublecortin domain-containing protein 2 [Homo sapiens]	586	52859	30	32,8
23	gi 448295	TLS protein	527	27422	40	36,9
28	gi 32356	unnamed protein product [Homo sapiens]	499	60719	28	30,3
39	gi 15809590	hnRNP Q1 [Homo sapiens]	373	62789	16	18,4
41	gi 38201710	probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 isoform 1 [Homo sapiens]	359	80906	27	11,5
50	gi 14042668	unnamed protein product [Homo sapiens]	268	71282	9	14,7
51	gi 14042873	unnamed protein product [Homo sapiens]	238	57860	9	15,6
52	gi 6912676	SNW domain-containing protein 1 [Homo sapiens]	238	61514	7	13,6
54	gi 1809248	siah binding protein 1 [Homo sapiens]	223	58131	8	18,5
56	gi 4503377	dihydropyrimidinase-related protein 2 isoform 2 [Homo sapiens]	220	62711	7	18
58	gi 6649581	proline oxidase 2 [Homo sapiens]	217	68430	9	8,8
62	gi 4504715	polyadenylate-binding protein 4 isoform 2 [Homo sapiens]	206	71080	9	11,5
63	gi 13376259	nuclear pore complex protein Nup85 [Homo sapiens]	200	75826	5	8,1
65	gi 2580550	dead box, X isoform [Homo sapiens]	167	73625	10	6,8
74	gi 4884358	hypothetical protein [Homo sapiens]	130	55720	4	7,6
75	gi 1616766	cationic trypsinogen, partial [Homo sapiens]	128	9200	5	35,7
76	gi 21665773	hypothetical helicase K12H4.8-like protein [Homo sapiens]	127	220227	3	2,1
77	gi 5911963	hypothetical protein [Homo sapiens]	127	41426	6	14,8
78	gi 7959341	KIAA1537 protein [Homo sapiens]	119	72020	3	5
79	gi 306891	90kDa heat shock protein [Homo sapiens]	116	83584	4	5
80	gi 24308207	leucine-rich repeat-containing protein 47 [Homo sapiens]	115	64004	3	7,2
81	gi 30506	desmoglein type 1 [Homo sapiens]	109	114670	6	3,3
82	gi 27883866	synembryn-A [Homo sapiens]	108	60847	4	7,6
83	gi 50400673	RecName: Full=Abl interactor 2; AltName: Full=Abelson interactor 2; Short=Abi-2; A	107	55686	3	5,7
84	gi 6808342	hypothetical protein [Homo sapiens]	103	52521	4	8,7
85	gi 1049086	SRp55-3, partial [Homo sapiens]	98	38548	4	7,5
86	gi 773575	archain [Homo sapiens]	97	53375	2	4
88	gi 28940	unnamed protein product [Homo sapiens]	85	57976	2	4,6
89	gi 5729877	heat shock cognate 71 kDa protein isoform 1 [Homo sapiens]	84	71082	3	7,4
90	gi 2865252	unknown [Homo sapiens]	82	66534	3	4,7
91	gi 28336	mutant beta-actin (beta'-actin) [Homo sapiens]	81	42128	4	10,4
92	gi 183082	glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase [Homo sapiens]	80	77497	3	5,6
93	gi 182385	long-chain acyl-CoA synthetase [Homo sapiens]	78	79324	2	3
94	gi 7706254	nucleolar protein 58 [Homo sapiens]	76	60054	3	4,5
95	gi 178995	arginase (EC 3.5.3.1) [Homo sapiens]	73	34883	4	6,8
96	gi 31092	unnamed protein product [Homo sapiens]	72	50437	3	4,1
97	gi 4759082	serum deprivation-response protein [Homo sapiens]	70	47202	3	5,9
98	gi 260436922	suprabasin isoform 1 precursor [Homo sapiens]	68	60562	3	6,1
99	gi 189036	nonmuscle myosin heavy chain (NMHC), partial [Homo sapiens]	68	145623	4	1,7
100	gi 27477136	zinc finger CCCH-type antiviral protein 1 isoform 1 [Homo sapiens]	67	103135	2	3,4
101	gi 307141	lysozyme precursor (EC 3.2.1.17) [Homo sapiens]	66	17000	2	8,1
102	gi 5360085	NY-REN-2 antigen [Homo sapiens]	66	61510	3	4,6
103	gi 3668141	PBK1 protein [Homo sapiens]	65	58439	1	2,5
104	gi 1665723	RPD3 protein [Homo sapiens]	65	55608	2	4,4
105	gi 4757926	RNA-binding protein 39 isoform b [Homo sapiens]	64	58905	2	5,3
106	gi 179331	B94 protein [Homo sapiens]	60	73016	2	3,5
107	gi 5453954	serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit delta isoform	59	70289	2	4,5
109	gi 755746	p85Mcm protein [Homo sapiens]	56	69791	2	4,4
110	gi 4929565	CGI-48 protein [Homo sapiens]	55	58127	2	5,6
111	gi 4505821	prolactin-inducible protein precursor [Homo sapiens]	55	16847	2	6,8
112	gi 13606056	DNA dependent protein kinase catalytic subunit [Homo sapiens]	55	470227	3	0,6
113	gi 5453682	protein HEXIM1 [Homo sapiens]	54	40884	1	4,7
114	gi 432654	nucleoporin p62 [Homo sapiens]	53	53460	1	2,1
115	gi 3387902	unknown [Homo sapiens]	51	52898	1	3,9
116	gi 4885165	cystatin-A [Homo sapiens]	50	11000	2	18,4
117	gi 4507297	syntaxin-binding protein 1 isoform a [Homo sapiens]	48	69091	2	3,5
118	gi 14042190	unnamed protein product [Homo sapiens]	48	57030	1	1,9
119	gi 2407301	DCHT [Homo sapiens]	47	30043	1	4,5
120	gi 29726225	Chain A, Structure Of Leukotriene A4 Hydrolase D375n Mutant	45	69736	2	4,9
121	gi 704348	paxillin [Homo sapiens]	45	62323	1	2,3
122	gi 553734	putative [Homo sapiens]	45	2269	44	38,1
123	gi 5031863	galectin-3-binding protein precursor [Homo sapiens]	44	66202	1	1,7
124	gi 693933	2-phosphopyruvate-hydratase alpha-enolase [Homo sapiens]	44	47421	1	3
125	gi 10439160	unnamed protein product [Homo sapiens]	43	19325	1	5,8
126	gi 186768	GLI-Krupple related protein [Homo sapiens]	41	45240	2	1,9
127	gi 3327192	KIAA0689 protein [Homo sapiens]	40	56746	1	2,6

Exon 6-Fragment mit Proteinlysats aus unbehandelten OAW-42 Zellen						
Hit No.	Accession No.	Protein Description	Score	Mass [Da]	Matches	Coverage [%]
21	gi 100816392	far upstream element-binding protein 3 [Homo sapiens] FUSEBP3	671	61944	28	33,9
25	gi 6176532	poly-U binding splicing factor PUF60 [Homo sapiens]	606	59706	43	33,8
27	gi 1040970	fus-like protein, partial [Homo sapiens]	577	53573	59	22,5
32	gi 5031512	NSAP1 protein [Homo sapiens]	472	62845	19	24,4
42	gi 21619663	Zinc finger, CCCH-type with G patch domain [Homo sapiens]	349	55934	13	20,9
47	gi 119623478	proline dehydrogenase (oxidase) 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	318	68559	11	22,5
56	gi 7959237	KIAA1488 protein [Homo sapiens]	230	98621	11	11
63	gi 2696613	ATP-dependent RNA helicase #46 [Homo sapiens]	150	93568	7	4,3
65	gi 2580550	dead box, X isoform [Homo sapiens]	139	73625	9	10
66	gi 1049086	SRp55-3, partial [Homo sapiens]	135	38548	4	7,5
70	gi 6808342	hypothetical protein [Homo sapiens]	118	52521	3	8,7
71	gi 14042151	unnamed protein product [Homo sapiens]	116	47732	4	9,3
72	gi 5911963	hypothetical protein [Homo sapiens]	110	41426	4	12,1
76	gi 10434102	unnamed protein product [Homo sapiens]	104	75810	2	3
77	gi 50400673	RecName: Full=Abl interactor 2; AltName: Full=Abelson interactor 2; Short=Abi-2; /	100	55686	3	4,1
78	gi 228543	splicing factor U2AF:SUBUNIT=large	98	53766	3	11,2
79	gi 28940	unnamed protein product [Homo sapiens]	90	57976	2	4,6
81	gi 4884358	hypothetical protein [Homo sapiens]	88	55720	3	5,2
82	gi 189174	DNA-binding protein [Homo sapiens]	88	45160	4	8,7
83	gi 773575	archain [Homo sapiens]	88	53375	4	6,4
84	gi 5729877	heat shock cognate 71 kDa protein isoform 1 [Homo sapiens]	87	71082	2	3,7
85	gi 532315	NF90 protein [Homo sapiens]	80	73977	4	2,7
86	gi 30506	desmoglein type 1 [Homo sapiens]	77	114670	3	2,9
87	gi 40850966	SNW1 protein, partial [Homo sapiens]	76	36026	3	7,8
88	gi 28592	serum albumin [Homo sapiens]	75	71316	3	4,8
89	gi 18105056	vacuolar protein sorting-associated protein 33A [Homo sapiens]	73	67967	3	7,2
90	gi 6180015	anaphase-promoting complex subunit 7 [Homo sapiens]	71	63764	2	5,3
91	gi 32356	unnamed protein product [Homo sapiens]	68	60719	2	2,3
92	gi 1616766	cationic trypsinogen, partial [Homo sapiens]	67	9200	3	35,7
93	gi 32488	unnamed protein product [Homo sapiens]	67	85020	3	3,6
94	gi 307141	lysozyme precursor (EC 3.2.1.17) [Homo sapiens]	66	17000	1	8,1
95	gi 2865252	unknown [Homo sapiens]	65	66534	2	4,7
96	gi 4929587	CGI-59 protein [Homo sapiens]	65	46123	2	6,5
97	gi 4505821	prolactin-inducible protein precursor [Homo sapiens]	60	16847	1	6,8
98	gi 3668141	PBK1 protein [Homo sapiens]	59	58439	2	2,5
99	gi 183353	glycogen phosphorylase (EC 2.4.1.1) [Homo sapiens]	56	97560	2	2,6
100	gi 6841462	HSPC120 [Homo sapiens]	54	52918	2	2,2
101	gi 24308207	leucine-rich repeat-containing protein 47 [Homo sapiens]	53	64004	2	5,1
102	gi 7022598	unnamed protein product [Homo sapiens]	53	52918	2	6
103	gi 14250583	CWF19L1 protein [Homo sapiens]	53	61350	2	4,8
104	gi 5107666	Chain A, Structure Of Importin Beta Bound To The Ibb Domain Of Importin Alpha	52	98484	2	3,1
105	gi 7023040	unnamed protein product [Homo sapiens]	51	55464	2	6,9
106	gi 62122917	filaggrin-2 [Homo sapiens]	49	249296	1	0,5
107	gi 8248765	VPS33B [Homo sapiens]	48	60863	2	5,5
108	gi 12804225	Unknown (protein for IMAGE:3543711), partial [Homo sapiens]	46	59887	2	6,1
109	gi 31092	unnamed protein product [Homo sapiens]	45	50437	1	2,4
110	gi 1730288	acetolactate synthase homolog [Homo sapiens]	45	68506	2	3
111	gi 5360085	NY-REN-2 antigen [Homo sapiens]	44	61510	2	2,1
112	gi 3387902	unknown [Homo sapiens]	43	52898	1	3,9
114	gi 4503377	dihydropyrimidinase-related protein 2 isoform 2 [Homo sapiens]	42	62711	1	3,1
115	gi 4759098	transformer-2 protein homolog beta isoform 1 [Homo sapiens]	42	33760	1	5,6
116	gi 704348	paxillin [Homo sapiens]	41	62323	1	2,3
117	gi 1657268	aminopeptidase [Homo sapiens]	40	99151	1	1,3
118	gi 178995	arginase (EC 3.5.3.1) [Homo sapiens]	39	34883	1	3,4
119	gi 5410336	myelin gene expression factor 2 [Homo sapiens]	38	58860	1	2

Exon 6-Fragment mit Proteinlysat von Cisplatin behandelten OAW-42 Zellen

Hit No.	Accession No.	Protein Description	Score	Mass [Da]	Matches	Coverage [%]
5	gi 337455	hnRNP C2 protein [Homo sapiens]	799	33335	116	41,9
18	gi 460771	hnRNP-E1 [Homo sapiens]	319	38015	21	26,1
19	gi 5032007	transcriptional activator protein Pur-alpha [Homo sapiens]	307	35003	22	27
20	gi 15147219	transcriptional activator protein Pur-beta [Homo sapiens]	302	33392	16	32,4
26	gi 1082585	mitogen-activated protein kinase kinase (EC 2.7.1.-) 3 [similarity] - human	257	36433	8	24,8
27	gi 9558733	transformer-2 protein homolog alpha [Homo sapiens]	237	32726	12	18,8
32	gi 4885153	crk-like protein [Homo sapiens]	196	33870	6	23,4
35	gi 23943880	methylthioribose-1-phosphate isomerase isoform 2 [Homo sapiens]	185	34679	8	18,6
38	gi 5031777	isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial precursor [Homo sapiens]	182	40022	6	11,2
43	gi 7706495	dnaJ homolog subfamily B member 11 precursor [Homo sapiens]	163	40774	5	12
47	gi 4501859	short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor [Homo sapiens]	145	47797	6	11,1
49	gi 29126836	MRPS9 protein, partial [Homo sapiens]	133	35297	4	19,5
50	gi 28882049	replication factor C subunit 2 isoform 2 [Homo sapiens]	125	35677	5	12,2
52	gi 3986482	translation initiation factor eIF3 p40 subunit [Homo sapiens]	119	40075	4	11,4
53	gi 15342081	Mitochondrial ribosomal protein L38 [Homo sapiens]	118	41017	5	12,4
54	gi 4506667	60S acidic ribosomal protein P0 [Homo sapiens]	116	34423	6	17
55	gi 337457	ribonucleoprotein La, partial [Homo sapiens]	107	40683	3	9,9
56	gi 4757880	mitotic checkpoint protein BUB3 isoform a [Homo sapiens]	102	37587	5	9,8
57	gi 4505405	transmembrane glycoprotein NMB isoform b precursor [Homo sapiens]	101	63345	7	4,8
58	gi 5107666	Chain A, Structure Of Importin Beta Bound To The Ibb Domain Of Importin Alpha	101	98484	2	3,1
59	gi 55956919	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B isoform a [Homo sapiens]	95	36059	4	7,2
60	gi 3493529	histone macroH2A1.2 [Homo sapiens]	93	39748	4	8,1
61	gi 1616766	cationic trypsinogen, partial [Homo sapiens]	92	9200	4	35,7
62	gi 337663	ORF1; putative [Homo sapiens]	91	40063	3	7,7
63	gi 25282469	retinol dehydrogenase 10 [Homo sapiens]	86	38747	3	7,6
64	gi 6678271	TAR DNA-binding protein 43 [Homo sapiens]	85	45053	2	7,2
65	gi 58037257	DDB1- and CUL4-associated factor 7 [Mus musculus]	84	39528	2	9,1
66	gi 1235727	unnamed protein product [Homo sapiens]	83	41118	4	6,7
67	gi 30506	desmoglein type 1 [Homo sapiens]	79	114670	4	2,8
68	gi 4885165	cystatin-A [Homo sapiens]	77	11000	3	30,6
69	gi 7023852	unnamed protein product [Homo sapiens]	75	33753	5	10
70	gi 2737886	NAD+-specific isocitrate dehydrogenase beta precursor [Homo sapiens]	74	42470	3	7,8
71	gi 178995	arginase (EC 3.5.3.1) [Homo sapiens]	73	34883	4	6,8
72	gi 4506489	replication factor C subunit 3 isoform 1 [Homo sapiens]	73	41328	3	7,3
73	gi 3746882	26S proteasome subunit 11 [Homo sapiens]	70	43188	3	5,3
74	gi 62089194	CSODF038YO05 variant [Homo sapiens]	68	37858	3	7,4
75	gi 36796	t-complex polypeptide 1 [Homo sapiens]	66	60869	3	5,4
76	gi 5730079	serine/arginine-rich splicing factor 10 isoform 1 [Homo sapiens]	63	22323	2	14,8
77	gi 4757988	probable cytosolic iron-sulfur protein assembly protein CIAO1 [Homo sapiens]	62	38842	3	8,3
78	gi 466491	geranylgeranyltransferase type I beta-subunit [Homo sapiens]	62	43224	2	5,8
79	gi 7020516	unnamed protein product [Homo sapiens]	61	42843	1	4,1
80	gi 4505821	prolactin-inducible protein precursor [Homo sapiens]	60	16847	2	6,8
81	gi 307200	brain glycogen phosphorylase [Homo sapiens]	60	99690	2	2,8
82	gi 21749793	unnamed protein product [Homo sapiens]	56	16080	3	15,3
83	gi 458726	estrogen responsive finger protein [Homo sapiens]	54	72597	4	4,9
84	gi 181486	DNA-binding protein B, partial [Homo sapiens]	53	39954	2	5,2
85	gi 1381027	phosphoribosylpyrophosphate synthetase-associated protein 39 [Homo sapiens]	52	39740	2	7
86	gi 4506589	RNA 3'-terminal phosphate cyclase isoform b [Homo sapiens]	51	39825	2	6,3
87	gi 62122917	filaggrin-2 [Homo sapiens]	51	249296	2	0,5
88	gi 4929587	CGI-59 protein [Homo sapiens]	49	46123	3	3,9
89	gi 307141	lysozyme precursor (EC 3.2.1.17) [Homo sapiens]	49	17000	1	8,1
90	gi 8923460	tRNA selenocysteine 1-associated protein 1 [Homo sapiens]	48	32762	2	8,4
91	gi 1654346	ubiquitin fusion-degradation 1 like protein [Homo sapiens]	46	39170	2	3,5
92	gi 22907044	DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3F isoform a [Homo sapiens]	45	45846	2	6,2
94	gi 460789	transformation upregulated nuclear protein [Homo sapiens]	42	51325	2	2,6
95	gi 11761619	mannose-1-phosphate guanyltransferase beta isoform 1 [Homo sapiens]	41	43306	2	2,8
96	gi 553734	putative [Homo sapiens]	40	2269	36	38,1

ncRNA mit Proteinlysate von Cisplatin behandelten OAW-42 Zellen

Hit No.	Accession No.	Protein Description	Score	Mass [Da]	Matches	Coverage [%]
1	gi 11935049	keratin 1 [Homo sapiens]	1318	66198	86	43
2	gi 47132620	keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal [Homo sapiens]	1307	65678	79	44,3
3	gi 181402	epidermal cytokeratin 2 [Homo sapiens]	1196	66110	72	44,8
4	gi 55956899	keratin, type I cytoskeletal 9 [Homo sapiens]	768	62255	53	48,8
5	gi 4503895	galactokinase [Homo sapiens]	674	42702	38	34,9
6	gi 28317	unnamed protein product [Homo sapiens]	674	59720	50	29,8
7	gi 306875	C protein [Homo sapiens]	639	32004	42	35,5
8	gi 337580	ribosomal protein L3, partial [Homo sapiens]	462	45726	27	29,1
9	gi 18999435	Keratin 5 [Homo sapiens]	440	62568	23	17,5
10	gi 9910244	28S ribosomal protein S22, mitochondrial [Homo sapiens]	381	41425	18	28,1
11	gi 460771	hnRNP-E1 [Homo sapiens]	349	38015	23	26,1
12	gi 5031839	keratin, type II cytoskeletal 6A [Homo sapiens]	348	60293	14	12,2
13	gi 119617032	keratin 6B, isoform CRA_a [Homo sapiens]	338	60159	16	11
14	gi 7688192	RNA 3'-terminal phosphate cyclase-like protein [Homo sapiens]	275	41301	15	20,9
15	gi 5031571	actin-related protein 2 isoform b [Homo sapiens]	232	45017	13	23,1
16	gi 31074631	keratin 1b [Homo sapiens]	218	62049	14	6,9
17	gi 4501885	actin, cytoplasmic 1 [Homo sapiens]	216	42052	11	27,2
18	gi 496078	L-iditol-2 dehydrogenase [Homo sapiens]	204	38899	9	21,8
19	gi 35570	unnamed protein product [Homo sapiens]	198	70508	10	12,2
20	gi 182399	farnesyl pyrophosphate synthetase (EC 2.5.1.1) [Homo sapiens]	194	40837	11	17,3
21	gi 4759098	transformer-2 protein homolog beta isoform 1 [Homo sapiens]	189	33760	6	13,5
22	gi 31092	unnamed protein product [Homo sapiens]	184	50437	10	10,4
23	gi 14141166	poly(rC)-binding protein 2 isoform b [Homo sapiens]	178	38597	14	14,4
24	gi 5032007	transcriptional activator protein Pur-alpha [Homo sapiens]	170	35003	8	22,4
25	gi 4501859	short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor [Homo sapiens]	168	47797	6	16,7
26	gi 12803709	Keratin 14 [Homo sapiens]	165	51905	13	8,5
27	gi 37492	alpha-tubulin [Homo sapiens]	159	50810	6	14
28	gi 5031777	isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial precursor [Homo sapiens]	159	40022	6	11,2
29	gi 28882049	replication factor C subunit 2 isoform 2 [Homo sapiens]	154	35677	6	14,1
30	gi 7106439	tubulin beta-5 chain [Mus musculus]	151	50095	6	13,5
31	gi 4758118	28S ribosomal protein S29, mitochondrial isoform 1 [Homo sapiens]	146	45880	7	12,6
32	gi 1195531	type I keratin 16 [Homo sapiens]	136	51548	11	8,2
33	gi 2078529	Hlark [Homo sapiens]	134	41769	6	10,9
34	gi 4519417	WD-40 repeat protein [Homo sapiens]	134	38814	5	16,6
35	gi 23243423	DHX36 protein [Homo sapiens]	133	112395	3	4
36	gi 4758796	developmentally-regulated GTP-binding protein 1 [Homo sapiens]	133	40802	4	14,4
37	gi 13182755	HPHRP [Homo sapiens]	124	39462	5	13,5
38	gi 7706495	dnaJ homolog subfamily B member 11 precursor [Homo sapiens]	117	40774	5	7,5
39	gi 186685	keratin type 16 [Homo sapiens]	117	51010	11	8,5
41	gi 7023557	unnamed protein product [Homo sapiens]	114	40907	4	9,7
42	gi 5031753	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H [Homo sapiens]	113	49484	5	9,8
43	gi 3493529	histone macroH2A1.2 [Homo sapiens]	112	39748	4	14
44	gi 23943880	methylthioribose-1-phosphate isomerase isoform 2 [Homo sapiens]	111	34679	4	10,6
45	gi 15342081	Mitochondrial ribosomal protein L38 [Homo sapiens]	110	41017	4	8,7
46	gi 337663	ORF1; putative [Homo sapiens]	104	40063	2	6,8
48	gi 307200	brain glycogen phosphorylase [Homo sapiens]	96	99690	3	4,1
49	gi 178995	arginase (EC 3.5.3.1) [Homo sapiens]	95	34883	6	7,1
50	gi 1235727	unnamed protein product [Homo sapiens]	92	41118	4	10,8
51	gi 181486	DNA-binding protein B, partial [Homo sapiens]	92	39954	3	7,4
52	gi 1616766	cationic trypsinogen, partial [Homo sapiens]	92	9200	5	35,7
53	gi 2737886	NAD+-specific isocitrate dehydrogenase beta precursor [Homo sapiens]	89	42470	4	9,4
54	gi 7023852	unnamed protein product [Homo sapiens]	86	33753	5	10
55	gi 4505405	transmembrane glycoprotein NMB isoform b precursor [Homo sapiens]	80	63345	6	4,8
56	gi 4502643	T-complex protein 1 subunit zeta isoform a [Homo sapiens]	79	58444	2	4,7
57	gi 4885153	crk-like protein [Homo sapiens]	77	33870	3	7,3
58	gi 9558733	transformer-2 protein homolog alpha [Homo sapiens]	76	32726	5	8,2
59	gi 30506	desmoglein type 1 [Homo sapiens]	76	114670	3	3,3
60	gi 4885165	cystatin-A [Homo sapiens]	75	11000	2	30,6
61	gi 4757880	mitotic checkpoint protein BUB3 isoform a [Homo sapiens]	72	37587	2	7,6
62	gi 29126836	MRPS9 protein, partial [Homo sapiens]	72	35297	2	9,6
63	gi 36100	unnamed protein product [Homo sapiens]	69	70154	4	4,6
64	gi 337457	ribonucleoprotein La, partial [Homo sapiens]	68	40683	2	3,9
65	gi 307141	lysozyme precursor (EC 3.2.1.17) [Homo sapiens]	66	17000	2	8,1
66	gi 31645	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]	66	36202	2	6,9
67	gi 1082585	mitogen-activated protein kinase kinase (EC 2.7.1.-) 3 [similarity] - human	62	36433	2	9,4
68	gi 1381027	phosphoribosylpyrophosphate synthetase-associated protein 39 [Homo sapiens]	55	39740	1	3,4
69	gi 11761619	mannose-1-phosphate guanylttransferase beta isoform 1 [Homo sapiens]	52	43306	1	2,8
70	gi 16751921	dermcidin preproprotein [Homo sapiens]	50	11391	1	12,7
71	gi 4505821	prolactin-inducible protein precursor [Homo sapiens]	48	16847	1	6,8

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Anja Wolf, geb. Fiedler
Geburtstag –u. ort: 21.02.1983, Halle/Saale
Anschrift: Emil-Abderhalden-Straße 34, 06108 Halle
Familienstand: verheiratet, 1 Kind (Jannis Wolf, geb. 27.06.2008)

Beruflicher Werdegang

01/10-12/13 Promotion am Institut für Pathologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (MLU)
12/07-12/09 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pathologie der MLU
12/06-11/07 Diplomarbeit am Institut für Pathologie der MLU
10/02-11/07 Studium der Biochemie/Biotechnologie an der MLU

Schulbildung

09/93-06/02 Christian-Wolff-Gymnasium, Halle/Saale
09/89-08/93 29.POS Grundschule, Halle/Saale

Wissenschaftliches Engagement

Vorträge

12/13 2. Doktorandenkongress der Medizinischen Fakultät der MLU, Halle/Saale, Deutschland

Posterpräsentationen

08/13 7. Internationaler MDM2-Workshop, Cambridge, UK
03/12 Teilnahme am Kongress: Posttranskriptionelle Kontrolle der Genexpression: Mechanismus und Rolle in der Pathogenese (GRK 1591), Halle (Saale), Deutschland
10/11 6. Internationaler MDM2-Workshop, New York, USA
11/11 1. Doktorandenkongress der Medizinischen Fakultät der MLU, Halle/Saale, Deutschland
10/10 Structural Biology of Modern RNA World, Murnau, Deutschland
09/09 ECCO 15 -34th ESMO Multidisciplinary Cancer Congress, Berlin

Praktika und Weiterbildungen

2010	Sachkundenachweis, "Tierschutz/Versuchstierkunde"
2005	Sachkundenachweis und -Prüfung nach § 5 Abs. 2 der Chemikalienverbotsverordnung
08/05-11/05	enzymkinetisches Praktikum am Agder-University-College in Kristiansand, Norwegen

Publikationsliste

Phillips, A., Teunisse, A., Lam, S., Lodder, K., Darley, M., Emaduddin, M., **Wolf, A.**, Richter, J., De Lange, J., Verlaan-De Vries, M., Lenos, K., Bohnke, A., Bartel, F., Blaydes, J.P., and Jochemsen, A.G. (2010). **HDMX-L is expressed from a functional p53-responsive promoter in the first intron of the HDMX gene and participates in an autoregulatory feedback loop to control p53 activity.** J Biol Chem 285, 29111-29127.

Wynendaele, J., Bohnke, A., Leucci, E., Nielsen, S.J., Lambertz, I., Hammer, S., Sbrzesny, N., Kubitza, D., **Wolf, A.**, Gradhand, E., Balschun, K., Braicu, I., Sehouli, J., Darb-Esfahani, S., Denkert, C., Thomssen, C., Hauptmann, S., Lund, A., Marine, J.C., and Bartel, F. (2010). **An illegitimate microRNA target site within the 3' UTR of MDM4 affects ovarian cancer progression and chemosensitivity.** Cancer Res 70, 9641-9649.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Frank Bartel für die Überlassung des Themas, das Vertrauen in meine Arbeit und die Hilfestellungen und Anregungen bei allen fachlichen Fragen.

Mein Dank gilt ebenso Stefanie Hammer, Frau Dr. Haak, Beate Heydel, Ilona Wiederhold, Sandra Ehrhardt und Ute Rolle für die Unterstützung, Anregungen bei Problemen und das angenehme Arbeitsklima innerhalb der Arbeitsgruppe.

Bei Prof. Dr. Wahle, vom Fachbereich Biochemie/Biotechnologie, möchte ich mich für seine Bereitschaft die Betreuung meiner Promotion zu übernehmen herzlich bedanken.

Für die Durchführung der Sequenzierungen möchte ich mich bei Frau Dr. Darmer vom Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung bedanken.

Danken möchte ich Dr. Gutschner und der Arbeitsgruppe von Sven Diederichs vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg (DKFZ) für die Hilfestellung bei der Durchführung des RNA-Pull-Downs.

Ein großer Dank gilt meinen Freunden, die mir während der Anfertigung meiner Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Michael, meinem Sohn Jannis und meiner Familie für die stetige Unterstützung und die aufmunternden Worte bei der Anfertigung meiner Dissertation.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Die aus fremden Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Dissertation wurde an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht. Ferner habe ich mich selbst noch um keinen Doktorgrad beworben.

Halle/Saale, den

Anja Wolf