

4 Ergebnisse – Teil 1 -

4.1 Identifikation von neuen Repräsentanten der Slfn-Gen-Familie

Im Rahmen von vorangehenden Arbeiten wurde eine partielle DNA identifiziert, dessen putativ kodierender 5'-Bereich eine signifikante Homologie zu den bereits beschriebenen Slfn3- und Slfn4-Proteinen aufwies. Nach vollständiger Klonierung durch 5'-RACE-PCR-Technik wurde ein putativer offener Leserahmen identifiziert, der 910 Aminosäuren kodiert. Aufgrund signifikanter Homologie der amino-terminalen Region wurde es als neues Mitglied der Slfn-Protein-Familie zugerechnet und als Slfn8 bezeichnet. Das Slfn8-Protein weist in den ersten 570 Aminosäuren eine 30%ige Identität und eine 50%ige Isofunktionalität zu den Slfn3- und Slfn4-Proteinen auf.

Um eine Basis für weitere Analysen zu haben, wurde die genomische Konfiguration von slfn8 nach Identifizierung von genomischen DNA-Fragmenten innerhalb einer Cosmid-Bibliothek durch PCR analysiert. Die genomische Organisation bildet die Grundlage für die Identifizierung der potentiellen Promotorregion aber auch für die Erarbeitung von Strategien zur Etablierung von „knock out“-Mäusen und für die Amplifikation der slfn8-cDNA zur Subklonierung in Expressionsvektoren. Für die Charakterisierung der genomischen Organisation des slfn8-Gens wurde die subgenomische DNA einer 129/Ola-Cosmid-Bibliothek mittels PCR durchsucht. Es wurden verschiedene slfn8-spezifische Oligonukleotide verwendet. Die auf dem LAWRIST7-Vektor basierende 129/Ola Cosmid-Bibliothek (RZPD Nummer 121) wurde von Ressourcen-Zentrum Berlin bereitgestellt. Die vier folgenden Cosmide P06130Q2, D2074Q1, E12428Q2 und P09246Q2 wurden durch diese PCR-Analysen als potentiell slfn8-Gen beinhaltende Vektoren identifiziert. Im Anschluss wurden die genomischen DNA-Anteile im wesentlichen nach Subklonierung von Restriktionsfragmenten charakterisiert. Zusammenfassend repräsentieren die vier Cosmide in überlappender Weise eine kontinuierliche genomische Region von ca. 125 kb. Innerhalb der ersten 10 kb konnte das slfn2-Gen identifiziert werden (Abb.: 4A). Neben dem slfn8-Gen wurden drei weitere Gene identifiziert, die hinsichtlich ihrer Organisation und Homologie der putativen Exonbereiche ebenfalls als weitere neue Mitglieder der Slfn-Gen-Familie zugerechnet werden konnten und als slfn5, slfn9 und slfn10 bezeichnet wurden. Die putativen Aminosäuresequenzen der neu identifizierten Slfn-Proteine zeigen im amino-terminalen Bereich keine bekannte Homologie zu anderen Proteinen. Die vollständige cDNA der neu identifizierten slfn-Gene wurde durch RT-PCR unter Verwendung von cDNA-Bibliotheken

von INF γ -stimulierten Knochenmarks-Makrophagen von C57BL/6 und 129 ISrJ Mäusen generiert. Die Zugriffsnummern für die neuen slfn-Gene lauten: slfn5 (B6), AY261804; slfn8 (B6), AY261798; slfn9 (B6), AY261800; slfn10 (B6), AY261802; slfn5 (129), AY261805; slfn8 (129), AY261799; slfn9 (129), AY261801; slfn10 (129), AY261803.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Slfn5, Slfn8, Slfn9 und Slfn10 nicht den bisher bestehenden zwei Untergruppen zuzuordnen ist. Der Carboxy-terminale Bereich weist eine weitere vierte Proteindomäne auf, die für die vier neuen Mitglieder charakteristisch ist (Abb.: 4B). Die Slfn5-, Slfn8-, Slfn9- und Slfn10-Proteine repräsentieren somit eine eigenen dritte Untergruppe innerhalb der Slfn-Protein-Familie, die untereinander sehr hohe Homologien in der Aminosäuresequenz aufweisen und die auf genomischem Niveau in einer geklusterten Konfiguration organisiert sind (Abb.: 4A).

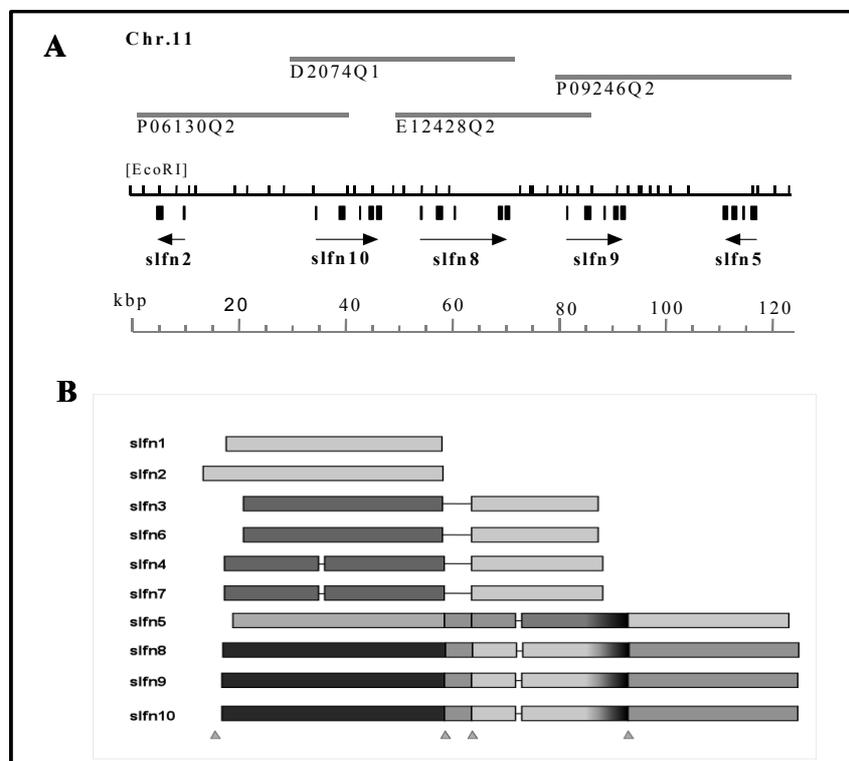


Abb. 4: Die genomische Konfiguration der vier neuen slfn-Gene und die Darstellung der homologen Regionen aller Slfn-Proteine

A. Die vier neuen Slfn-Mitglieder wurden durch Sequenzierung von EcoRI-Fragmenten von vier Cosmiden identifiziert und sind auf genomischem Niveau in einer geklusterten Konfiguration organisiert. Die überlappenden Sequenzbereiche der vier sequenzierten Cosmide repräsentieren ca. 125 kb vom Chromosom 11 einer 129/Ola-Maus, in denen slfn2, slfn5, slfn8, slfn9 und slfn10 lokalisiert wurden. Die Pfeile kennzeichnen die Orientierung, in der die individuellen Gene transkribiert werden. Die slfn5, slfn8, slfn9 und slfn10-Gene enthalten jeweils fünf Exons.

B. Schematische Darstellung der Proteindomänen und der homologen Bereiche der Slfn-Proteine. Die Untergruppe I umfasst Slfn1 und Slfn2, die der Untergruppe II Slfn3, Slfn4, Slfn6 und Slfn7, und die der dritte Untergruppe enthält die neuen Slfn5-, Slfn8-, Slfn9- und Slfn10-Proteine. Die Dreiecke kennzeichnen die Verbindungen zwischen den einzelnen Proteindomänen, die von den jeweiligen Exons kodiert sind. Die homologen Proteindomänen werden durch gleiche Farb-Schattierungen gekennzeichnet. Diese Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Dr. Jens Zerrahn bereitgestellt.

Allelspezifische Differenzen innerhalb der neu identifizierten Slfn-Proteinfamilienmitglieder der Untergruppe III zwischen den Inzuchtstämmen C57BL/6 und 129/ISvJ sind gering, jedoch signifikant. Im Gegensatz zum 129/ISvJ-Mausstamm weist die Gensequenz von slfn10 in C57BL/6-Mäusen ein Stop-Codon an der Aminosäureposition 59 auf, wodurch die Expression eines kompletten, funktionellen Proteins nicht möglich sein sollte. Slfn8, Slfn9 und Slfn10 haben untereinander einen aussergewöhnlichen Grad der Homologie in der Aminosäuresequenz, die sich über die komplette Proteinsequenz durch eine 87%ige Identität auszeichnet. Slfn5 hat gegenüber den anderen Mitgliedern der dritten Untergruppe eine Identität von 40% und eine isofunktionelle Ähnlichkeit von 60%. Offensichtlich sind jedoch die konservierten Motive innerhalb der gesamten Slfn-Mitglieder und die Regionen, die charakteristisch für die dritte Gruppe sind. Für die Suche nach funktionell relevanten Protein-Motiven wurden Datenbankvergleiche, mit Prosite, BLOCKS und Pfam [<http://mgd.ashc.umn.edu/panal/>], durchgeführt. Die Sequenzvergleichsanalysen demonstrieren, dass innerhalb der carboxy-terminalen Region, die die Subgruppe III charakterisiert, eine ATP/GTP-bindende Domäne und eine DEAQ-Region mit einem Walker-Motiv vorzufinden ist. Dies ist charakteristisch für ATPase-Aktivität aufweisende Proteine (Fry et al., 1986; Saraste et al., 1990; Walker et al., 1982). Der Sequenzvergleich mit der NCBI-CCD-Datenbank zeigt des Weiteren eine signifikante Homologie zu Motiven, die typisch für RNA/DNA-Helikasen sind. Helikasen, die zur Superfamilie I gehören, enthalten in der Regel acht charakteristisch aufeinanderfolgende Motive (Caruther et al., 2002; de la Cruz et al., 1999; Gorbalenya et al., 1993; Linder et al., 2000). Die Analyse der Aminosäuresequenz enthüllt die Anwesenheit einer konservierten Region mit einer auffälligen Homologie zur Helikasen der Superfamilie-I (pfam01443), speziell zu RNA-Helikasen von Einzelstrang-RNA-Viren. Des Weiteren existiert eine konservierte Region im amino-terminalen Anteil der Moleküle, die eine partielle Homologie zu einer konservierten Domäne zeigt, die in prokaryontischen und eukaryontischen Proteinen zu finden ist und die potentiell eine Funktion als transkriptionelle Regulatoren oder Helikasen erfüllt. Die Identifikation einer putativen Helikasedomäne innerhalb der neuen Slfn-Proteine deutet darauf hin, dass diese Proteine eine RNA-Helikase oder eine RNA-Struktur modellierende Aktivität besitzen könnten und somit essentielle Funktionen innerhalb des RNA-Metabolismus ausüben könnten.

4.2 Ektopische Slfn-Expression in NIH3T3-Fibroblasten

Hedrick und Mitarbeiter zeigten, dass Slfn1, insbesondere aber auch Slfn2 und Slfn3, eine antiproliferative Aktivität besitzen. Ektopische Expression von Slfn1, Slfn2 und Slfn3 induziert in Fibroblasten eine Wachstumsarretierung (Schwarz et al., 1999). Sie postulierten, dass Slfn-Proteine generell die Zellproliferation negativ beeinflussen. Um zu testen, inwieweit die neu identifizierten Slfn-Proteine eine antiproliferative Eigenschaft besitzen und damit einen Einfluss auf das zelluläre Wachstum haben, wurden diese ektopisch in NIH3T3-Fibroblasten exprimiert. Als Kontrolle diente Slfn1, das Proliferations-inhibierend in Fibroblasten wirkt. DNA-Sequenzanalysen zeigten, dass Slfn1 über zwei putative Translationsinitiationskodons (Kozak-Sequenzen) verfügt (Schwarz et al., 1999). Welche der beiden Kozak-Sequenzen für die Translationsinitiation des funktionellen Slfn1-Proteins genutzt wird, ist bisher nicht definiert. Es wurde angenommen, dass wahrscheinlich das erste ATG für die Translationsinitiation genutzt wird. In vorangehenden Arbeiten wurde das zweite ATG (entspricht Slfn1-Protein, das am amino-terminalen Ende um 27 Aminosäuren kürzer ist) ebenfalls als mögliches Initiations-ATG diskutiert (Schwarz et al., 1999). Aus diesem Grund sollte geklärt werden, ob es funktionelle Unterschiede zwischen beiden Slfn1-Proteinen gibt und wenn ja, welches der beiden ATGs für die Generierung des antiproliferativ wirkenden Slfn1-Proteins benötigt wird.

Um zu prüfen, ob es funktionelle Unterschiede zwischen den Slfn1-Proteinen mit dem ersten oder mit dem zweiten ATG gibt, wurden zunächst beide slfn1-cDNAs mit spezifischen Oligonukleotiden in einer PCR-Reaktion amplifiziert, in retrovirale Expressionsvektoren (pMSCV2.2-IRES-GFP) kloniert und diese für die ektopische Expression in Fibroblasten eingesetzt. Als genetisches Transfersystem wurde die Methode der retroviralen Transduktion genutzt, die eine stabile Integration der slfn-Gene in das Genom und eine konstitutive Proteinexpression in den Zielzellen erlaubt. Unter Verwendung retroviraler Plasmide mit verschiedenen slfn-cDNAs und Phoenix-eco Verpackungszelllinien, wurden rekombinante Retroviren generiert. Als retroviraler Vektor wurde das Plasmid pMSCV2.2-IRES-GFP verwendet, welches nach Klonierung der slfn-cDNAs eine bicistronische mRNA mit GFP (grün-fluoreszierendes Protein) als Markergen exprimiert. Aufgrund der vorhandenen IRES-Sequenz (internal ribosomal entry site) in der transkribierten slfn-IRES-GFP mRNA können die individuellen Slfn-Proteine und das GFP-Protein separat voneinander exprimiert werden. Da die transkribierten genetischen Informationen von den individuellen slfn-Genen und dem GFP-Gen auf einer mRNA zu finden sind, kann angenommen werden, dass die Expression des GFP-Proteins mit dem Expressionsniveau der Slfn-Proteine annähernd korreliert. Die für

die Transduktion verwendeten retroviralen Partikel wurden mit folgenden retroviralen Plasmiden generiert: Δ Slfn1 repräsentiert dabei das um 27 Aminosäuren kürzere Slfn1-Protein.

BEZEICHNUNG DER RETROVIRALEN PLASMIDE	EXPRESSION VON:
pMSCV-2.2-IRES-GFP (Kontrolle)	nur GFP
pMSCV- Δ slfn1	Δ Slfn1 und GFP
pMSCV-slfn1	Slfn1 und GFP
pMSCV-slfn5	Slfn5 und GFP
pMSCV-slfn8	Slfn8 und GFP
pMSCV-slfn9	Slfn9 und GFP
pMSCV-slfn10	Slfn10 und GFP

Abb. 5: Tabellarische Erfassung der verwendeten retroviralen Plasmide für die Generierung verschiedener rekombinanter Retroviren

Die variablen slfn-cDNAs wurden einschließlich einer Sequenz für ein amino-terminales Myc-Epitop in den retroviralen Vektor pMSCV2.2-IRES-GFP kloniert. Die retroviralen Plasmide wurden mittels Calcium-Phosphat-Transfektion in Phoenix eco Verpackungszelllinien transfiziert und die daraus generierten Retroviren für die Transduktion der NIH3T3-Fibroblasten verwendet. Δ Slfn1 repräsentiert das um 27 Aminosäuren kürzere Slfn1-Protein, dass das zweite ATG als Translationsinitiationkodon nutzt.

NIH3T3 Fibroblasten haben sich in Vorexperimenten als geeignete Modellzelllinie erwiesen, mit denen die beschriebene Slfn1-vermittelte Wachstumsarretierung nachvollzogen werden konnte. Deshalb wurden Slfn5, Slfn8, Slfn9 und Slfn10 in analoger Weise zu beiden Slfn1-Proteinvarianten nach Expression in NIH3T3 Fibroblasten analysiert.

Um die Konzentration der retroviralen rekombinanten Partikel qualitativ und quantitativ einschätzen zu können, wurden NIH3T3 Fibroblasten zunächst für 8h transduziert. Die Transduktionsrate wurde nach 48h mittels durchflusszytometrischer Analyse (FACS-Analyse) bestimmt. Der Anteil GFP⁺ Zellen und das Expressionsniveau sollte mit der Transduktionsrate und der Anzahl der integrierten Vektoren direkt korrelieren. Für die FACS-Analysen wurden nicht-transduzierte Zellen als Negativkontrolle genutzt, die in Abbildung 5 als graue Kurve im Histogramm-Blot dargestellt ist. Die mit den Ausgangsvektor (pMSCV-2.2-IRES-GFP) generierten rekombinanten Retroviren wurden als Positivkontrolle für die Transduktion der Fibroblasten verwendet.

Die durchflusszytometrischen Analysen zeigen, dass in der Regel eine Transduktionsrate von ca. 85-95 % erreicht wurde. Die stärkste GFP-Expression wurde in den Fibroblasten beobachtet, die mit dem Kontrollvirus (pMSCV) infiziert wurden. Fibroblasten, die mit den rekombinanten Δ slfn1- slfn1-, slfn9- und slfn10- Retroviren transduziert wurden, zeigten eine eher moderate GFP-Expression. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass eine effiziente und homogene Transduktion von Fibroblasten durch die potente Generation von rekombinanten Retroviren mit hohen Titern vermittelt werden kann.

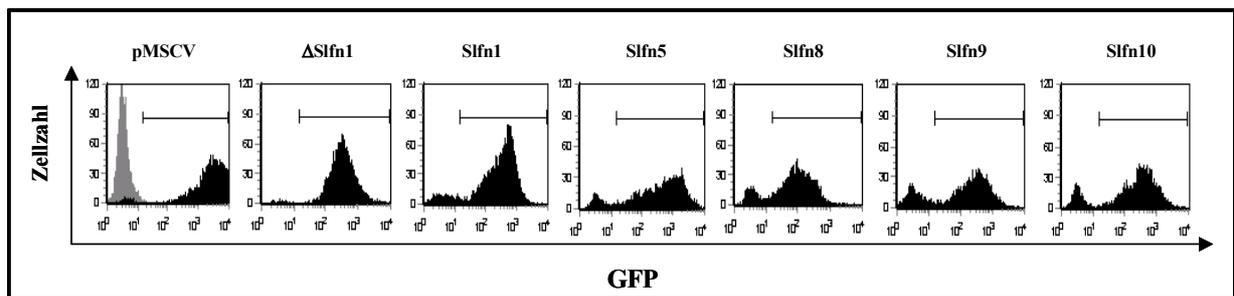


Abb. 6: FACS-Analysen zur qualitativen Prüfung der verschiedenen retroviralen Titer

NIH3T3 Fibroblasten wurden mit verschiedenen rekombinanten Slfn-Retroviren infiziert. Die Transduktionsrate wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Die Darstellung erfolgt im Histogramm-Blot, wobei die Abzisse, die Anzahl der analysierten Zellen und die Ordinate die Intensitäten der GFP-Signale repräsentieren.

Um zu analysieren, ob die Stärke der GFP-Expression mit der Expression der individuellen Slfn-Proteine korreliert, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt, die eine quantitative Analyse der retroviral exprimierenden Slfn-Proteine in den transduzierten Fibroblasten ermöglicht. Das am amino-terminalen Ende der Slfn-Proteine fusionierte myc-Epitop gestattet die vergleichende Analyse der individuellen Slfn-Protein-Expressionsniveaus im Western-Blot und damit den Vergleich zum Expressionsniveau der GFP-Proteine, die in den individuell transduzierten Fibroblasten in den FACS-Analysen gefunden wurde.

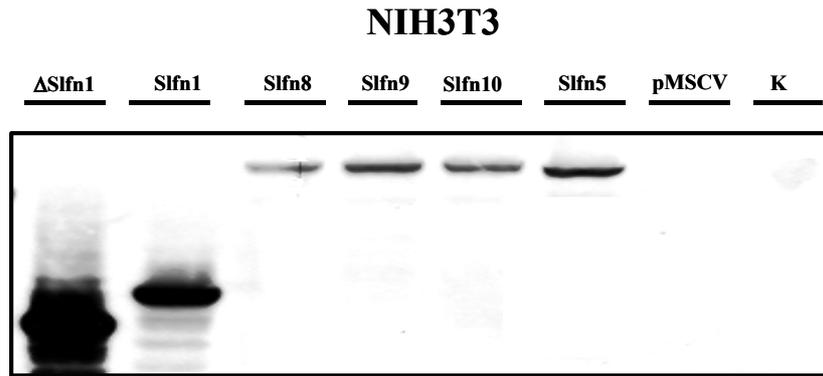


Abb. 7: Nachweis der Slfn-Protein-Expression durch Western-Blot-Analysen

Von den individuell transduzierten Fibroblasten wurden Zellysate hergestellt. Die Proteinmengen von gleichen Zellzahlen wurden in einem 10 %igen SDS-Acrylamid-Gel aufgetrennt und geblottet. Zur spezifischen Slfn-Protein-Detektion wurde ein anti-myc Antikörper (9-E10) verwendet. Unter Anwendung eines HPO-konjugierten anti-Maus-Antikörpers wurden die Slfn-Proteine durch eine Chemolumineszenz-Reaktion detektiert

Die stärkste Expression wurde für das am amino-terminalen Ende um 27 Aminosäuren verkürzte Slfn1-Protein (Δ Slfn1) beobachtet (Abb.7). Das retroviral exprimierte Slfn1-Protein ist im Vergleich zum Δ Slfn1-Protein auf einem geringfügig verminderten Niveau exprimiert. Vergleichend zur Expression der beiden Slfn1-Protein-Versionen ist das Expressionsniveau der Slfn5-, Slfn8-, Slfn9- und Slfn10-Proteine um ein vielfaches geringer. Vergleicht man dahingegen die Expression der Slfn-Proteine der dritten Subgruppe untereinander, dann sind nur unwesentliche Unterschiede festzustellen. Wenn man nun das GFP-Expressionsprofil der verschiedenen transduzierten Fibroblasten mit dem Expressionsniveau der Slfn-Proteine vergleicht, so ist eine direkte Korrelation nicht eindeutig zu erkennen. Die FACS-Analysen zeigen am Beispiel der slfn1- und slfn9-transduzierten Fibroblasten in etwa ein gleiches GFP-Expressionsprofil, während in den Western-Blot-Analysen signifikant weniger vom Slfn9-Protein im Vergleich zum Slfn1-Protein detektiert wurde. Andererseits ist die Zahl der GFP⁺-Zellen in den slfn9-transduzierten Fibroblasten etwas geringer als im Vergleich zu den slfn1-transduzierten Fibroblasten, was möglicherweise der Grund für die geringere Signalintensität des Slfn9-Proteins im Western-Blot ist.

4.3 Wachstumsanalysen von transduzierten NIH3T3 Fibroblasten

Um die Auswirkungen einer ektoptischen Slfn-Expression auf das Wachstum von NIH3T3 Fibroblasten zu prüfen, wurden die Zellen in einem Parallelansatz mit den zuvor beschriebenen rekombinanten Slfn-Retroviren transduziert. Um in etwa ein vergleichbares Slfn-Protein-Expressionsprofil zu haben, wurden transduzierte Fibroblasten mit etwa gleichem GFP-Expressionsniveau 24h nach Transduktion mittels FACS sortiert. Die Zahl an lebenden Zellen wurde 72h nach Transduktion bestimmt. Der prozentuale Anteil der Slfn-exprimierenden NIH3T3 Fibroblasten ist in Abb.8 dargestellt.

Die Expression von Δ Slfn1, Slfn5, Slfn8, Slfn9 und Slfn10 hat keinen Einfluss auf die Proliferation von transduzierten Fibroblasten, da die Zellzahlen im Vergleich zu den pMSCV-transduzierten (kontroll-transduzierten) Zellen gleich sind (Abb.:8). Nur das Slfn1-Protein mit dem kompletten N-Terminus induziert in den transfizierten Fibroblasten eine signifikante Reduktion des zellulären Wachstums. Im Vergleich zu den Kontroll-transduzierten Fibroblasten ist die Zahl der Fibroblasten, die mit dem rekombinanten Slfn1-Retrovirus infiziert wurden, ca. um 90 % geringer. Des Weiteren fiel auf, dass in Slfn1-transduzierten Kulturen ein hoher Anteil von toten Zellen im Kulturüberstand zu beobachten war. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Integrität der amino-terminalen Region für die Funktionalität des Slfn1-Proteins hinsichtlich der antiproliferativen Aktivität und der Zellzykluskontrolle essentiell ist. Zusammenfassend wird deutlich, dass es keine Hinweise auf die Nutzung beider ATGs gibt. Demzufolge scheint das erste ATG für die Funktion des Slfn1-Proteins als negativer Regulator des zellulären Wachstums eine bedeutende Rolle zu übernehmen. Die ektoptische Expression des um 27 Aminosäuren kürzeren Slfn1-Proteins hat dahingehend keine negativ regulierende Wirkung auf das proliferative Verhalten von Fibroblasten und ist daher für weiterführende Analysen belanglos.

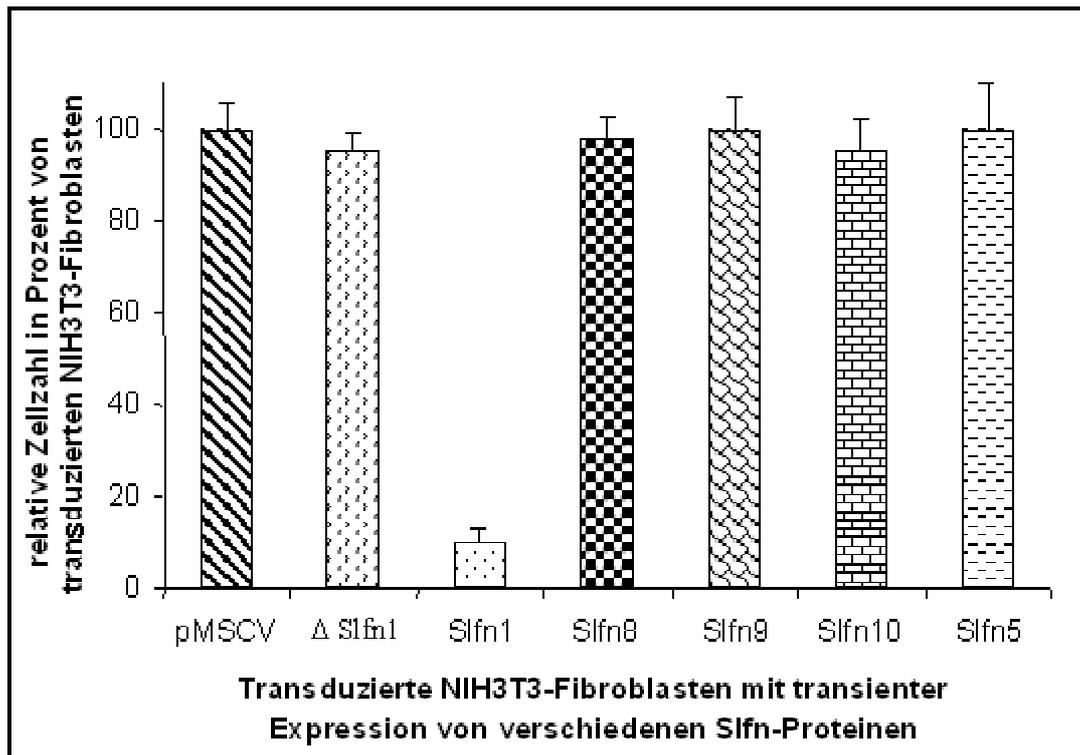


Abb. 8: Wachstumsanalysen von Slfn-exprimierenden NIH3T3 Fibroblasten 72 h nach retroviraler Transduktion

NIH3T3 Fibroblasten wurden mit verschiedenen Slfn-Retroviren infiziert. 72h nach Transduktion wurden die absoluten Zellzahlen bestimmt. Von jedem Transduktionsansatz wurden Dreifachbestimmungen in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

Die Analyse der Proliferation von Transiente Slfn-exprimierenden Fibroblasten lässt allerdings keine Rückschlüsse zu, ob eine konstitutive Slfn-Expression auf das langzeitliche Zellwachstum einen Effekt hat. Um den Einfluss einer konstitutiven Slfn-Expression auf das proliferative Verhalten von transduzierten Fibroblasten zu untersuchen, wurde das Wachstum der Zellen im Verlauf von 5 Tagen beobachtet. Hierzu wurden zunächst Zellen mit den individuellen rekombinanten Slfn-Retroviren infiziert. 72h nach Transduktion wurden die lebenden GFP positiven Zellen mittels FACS sortiert und für weitere 5 Tage kultiviert.

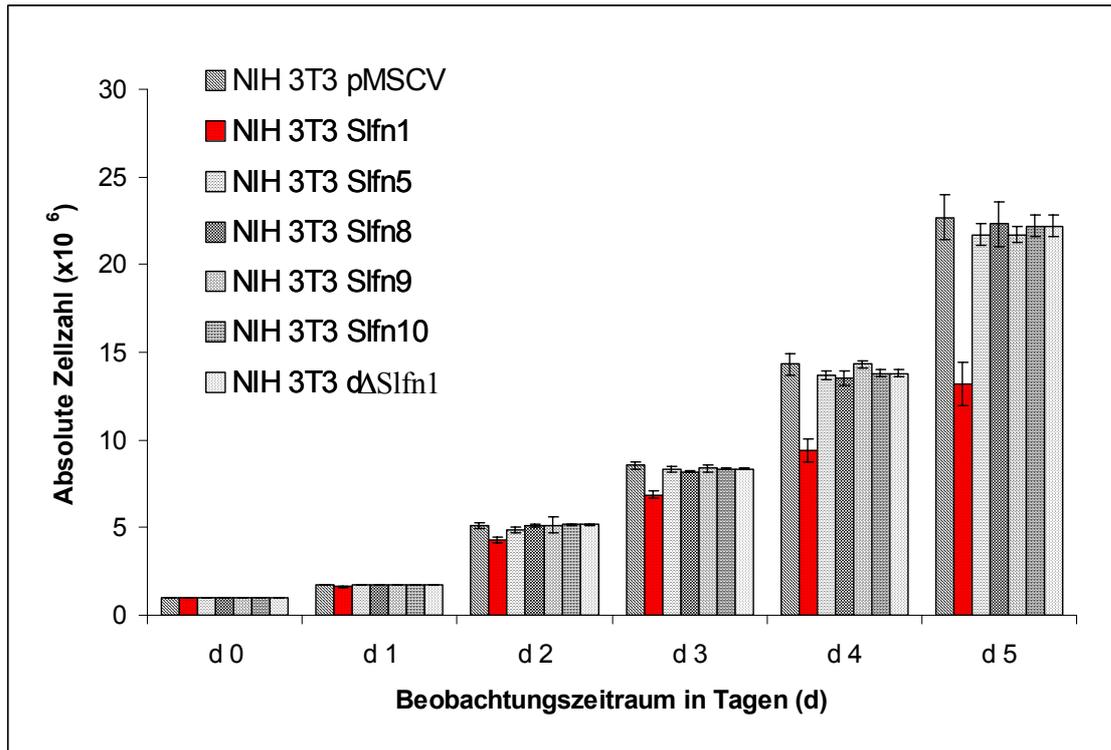


Abb. 9: Wachstumsanalysen von NIH3T3 Fibroblasten mit konstitutiver Slfn-Expression

NIH3T3 Fibroblasten wurden mit verschiedenen Slfn-Retroviren infiziert. 72h nach retroviraler Infektion wurden die lebenden und GFP-exprimierenden Fibroblasten sortiert, gezählt und in gleichen Mengen in dreifach Ansätzen für jeden Zeitpunkt in Kultur genommen. Die Zellzahl wurde im Verlauf von 5 Tagen (d) bestimmt.

Auch bei diesem Experiment wird deutlich, dass der komplette amino-terminale Bereich für die antiproliferative Aktivität des Slfn1-Proteins notwendig ist. Im Vergleich zur verkürzten Version des Slfn1-Proteins (Δ Slfn1) konnte eine signifikante Verminderung der absoluten Zellzahl von Fibroblasten, die das komplette Slfn1-Protein exprimieren, beobachtet werden (Abb.9). Des Weiteren ist zu erkennen, dass eine konstitutive Expression von Slfn5, Slfn8, Slfn9 und Slfn10 nicht zu einer Veränderung der Proliferationsrate von NIH3T3 Fibroblasten führt. Diese Experimente geben keinen Hinweis auf eine Beteiligung der Slfn-Proteine der dritten Untergruppe an der Wachstumsregulation und somit an der Kontrolle des Zellzyklusses in NIH3T3 Fibroblasten. Dies wird ebenfalls durch die Beobachtung gestützt, dass auch nach mehreren Wochen die Expression von Slfn5, Slfn8, Slfn9 und Slfn10 in den etablierten Fibroblasten-Zelllinien konstant bleibt, ohne dass dies einen Einfluss auf das zelluläre Wachstum hat. Die nachfolgenden durchflusszytometrischen Analysen belegen, dass die GFP-Expression und damit auch die Expressionen von Slfn5, Slfn8, Slfn9, Slfn10 und Δ Slfn1 nach 4 wöchigem Wachstum in den Fibroblasten konstant bleiben (Abb.10).

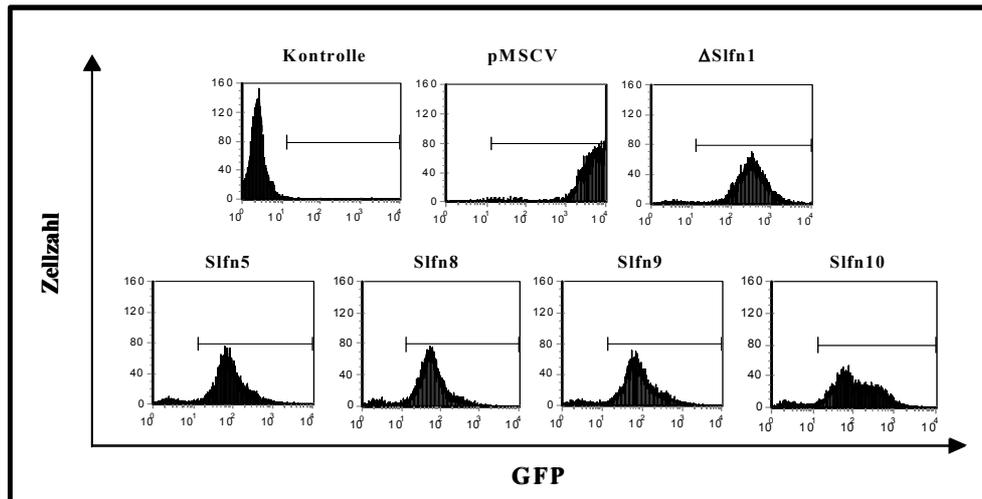


Abb. 10: Durchflusszytometrische Analysen von NIH3T3 Fibroblasten mit und ohne Slfn-Expression

NIH3T3 Fibroblasten wurden mit pMSCV- oder mit verschiedenen Slfn-Retroviren transduziert, 72h nach Infektion sortiert, für weitere 4 Wochen kultiviert und die GFP-Expression mittels FACS analysiert.

Im Fall der Slfn1-exprimierenden Fibroblasten konnten zwar nach diesem Zeitraum noch GFP-exprimierende Zellen nachgewiesen werden, dennoch ist das Wachstum nicht so drastisch eingeschränkt, wie es im vorherigen Experiment beschrieben wurde. Möglicherweise ist diese Beobachtung auf eine Veränderung in der Slfn1-Proteinexpression zurückzuführen. Um zu prüfen, ob sich das Slfn1-Expressionsniveau im Verlauf einer langzeitlichen Kultivierung der Slfn1-transduzierten Fibroblasten verändert und dies der Grund für die Annäherung an ein normales Zellwachstum sein könnte, wurden die sortierten GFP-exprimierenden Zellen für weitere 11 Tage (entspricht 14d nach Transduktion) kultiviert und die Zellen für die Analyse im Western-Blot nach verschiedenen Zeitpunkten der Kultur geerntet und lysiert. Als Kontrollen wurden die pMSCV- und Δ Slfn1-transduzierten Zellen ebenfalls für den gleichen Zeitraum kultiviert und die resultierenden Zelllysate für die Western-Blot-Analysen verwendet.

Die Abbildung 11 zeigt die Detektion eines kleineren Proteinproduktes nach einer 14tägigen Kultivierung der Slfn1-transduzierten GFP⁺-Fibroblastenzellen. Der Grund für die Akkumulation dieser Slfn1-Variante ist bislang nicht geklärt. Mutationen bei der Generierung der rekombinanten Retroviren könnten für das Auftreten der verkürzten Slfn1-Variante verantwortlich sein. Am wahrscheinlichsten ist jedoch anzunehmen, dass insbesondere die Fibroblasten akkumulieren, die nicht-funktionelle Varianten des Slfn1-Proteins exprimieren. In den frühen Phasen der Slfn1 Expression (1d und 3d nach retroviraler Transduktion) kann

die kürzere Slfn1-Variante nicht beobachtet werden. Im Vergleich dazu bleibt das Δ Slfn1-Protein in der ursprünglichen Form erhalten (Abb. 11).

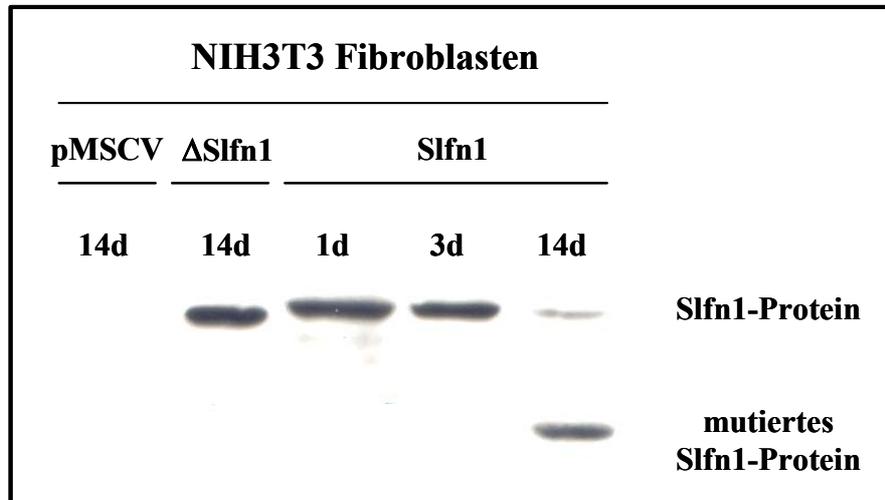


Abb.11: Western-Blot-Analysen zur Darstellung der Slfn1-Expression von transduzierten NIH3T3 Fibroblasten nach verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung

NIH3T3 Fibroblasten wurden entweder mit dem pMSCV- oder mit dem Slfn1-Retroviren transduziert, die GFP-exprimierenden Zellen 3d nach Infektion sortiert, für weitere 11 Tage kultiviert und die hergestellten Proteinlysate in einem 10 %igen SDS-Acrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Als Kontrollen wurden Proteinlysate von Kontroll- und Δ Slfn1-transduzierten Fibroblasten verwendet. Als weitere Kontrollen wurden Proteinlysate von sortierten Slfn1-transduzierte Fibroblasten 1d und 3d nach Transduktion verwendet. Zur spezifischen Slfn-Protein-Detektion wurde ein Antikörper (9-E10), der das an den jeweiligen Slfn-Proteinen fusionierte myc-Epitop erkennt, verwendet. Unter Verwendung eines HPO-konjugierten anti-Maus-Antikörpers wurden die Slfn-Proteine durch Chemolumineszenz-Reaktion detektiert

Es ist anzunehmen, dass das mutierte Slfn1-Protein die Proliferations-inhibitorische Wirkung verloren hat und dies zur einer verstärkten Akkumulation von Fibroblasten führt, die zwar noch das GFP-Protein exprimieren, jedoch im Vergleich zu Zellen, die das komplette nicht „mutierte“ Slfn1-Protein exprimieren, ein normales Wachstum aufweisen. Folglich nimmt der Anteil von Fibroblasten, die das „mutierte“ nicht wachstums-inhibierende Slfn1-Protein exprimieren, innerhalb der langzeitlichen Kultivierung zu und erklärt dadurch die geringeren werdenden Unterschiede im Wachstum zwischen Kontroll- und Slfn1-transduzierten Fibroblastenzellen.

Zusammenfassend wird deutlich, dass nicht nur der komplette amino-terminale Bereich sondern auch das gesamte Protein für die Funktionalität von Slfn1 und in Bezug auf die antiproliferative Wirkung essentiell ist. Dem gegenüber zeigen Fibroblasten, die entweder das Slfn1-Protein ohne den amino-terminalen Bereich oder das mutierte Slfn1-Protein exprimieren, ein normales proliferatives Verhalten und sind somit nicht an der Regulation des

Zellzyklusses beteiligt. Aus diesem Grund wurden weiterführende Analysen mit dem kompletten Slfn1-Protein durchgeführt.

4.4 Intrazelluläre Lokalisation von Slfn-Proteinen in transfizierten NIH3T3-Fibroblasten

Proteine, die intrazellulär regulatorische Funktionen übernehmen, sind mit spezifischen Kompartimenten der Zelle assoziiert. Die subzelluläre Verteilung der Slfn-Proteine ist unbekannt, da bisher auch keine spezifischen Antikörper für die Detektion der Proteine generiert wurden. Durch die Bestimmung der subzellulären Lokalisation von den individuellen Slfn-Proteinen könnten Informationen über die Orte der physiologischen Slfn-Protein-Funktionen gewonnen werden.

Um einen ersten Einblick zu vermitteln, wurde die subzelluläre Lokalisation der individuellen Slfn-Proteine ermittelt. Dazu wurden die cDNAs von slfn1, slfn5, slfn8, slfn9 und slfn10 in den pCMV-myc-Expressionsvektor inseriert. Das am amino-terminalen Bereich der Slfn-Proteine fusionierte myc-Epitop erlaubte die Detektion der subzellulären Lokalisation der individuellen Slfn-Proteine nach transienter Expression in NIH3T3 Fibroblasten. Die individuellen pCMV-myc slfn-Expressionsvektoren wurden transient in NIH3T3 Fibroblasten transfiziert, auf spezielle Objektträger für die Immunfluoreszenzmikroskopie übertragen und 24h nach Transfektion zunächst mit den anti-myc-mAk (1-9E10-2) behandelt und anschliessend mit einem Cy3-konjugierten-Ziege-anti-Maus-Antikörper gefärbt.

Eine differentielle Lokalisation der individuellen Slfn-Proteine konnte durch Konfokal- und Immunfluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. Slfn1 wird sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus gefunden. Im Gegensatz dazu wurde Slfn4 primär im Zytoplasma detektiert, wobei ein geringer Anteil auch in der perinuklearen Region nachgewiesen werden konnte. Slfn5 und Slfn10 sind hauptsächlich im Nukleus lokalisiert, wobei eine geringfügige Akkumulation auch im Zytoplasma zu beobachten ist. Dahingegen kann Slfn8 primär im Zytoplasma und zu einem geringen Anteil im Nukleus nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu scheint die Funktion des Slfn9-Proteins exklusiv im Nukleus ihre Bedeutung zu haben. Trotz der hohen Homologie zwischen den Slfn-Proteinen der dritten Untergruppe sind distinkte Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation zu beobachten und damit sind auch differentielle Funktionen zu erwarten.

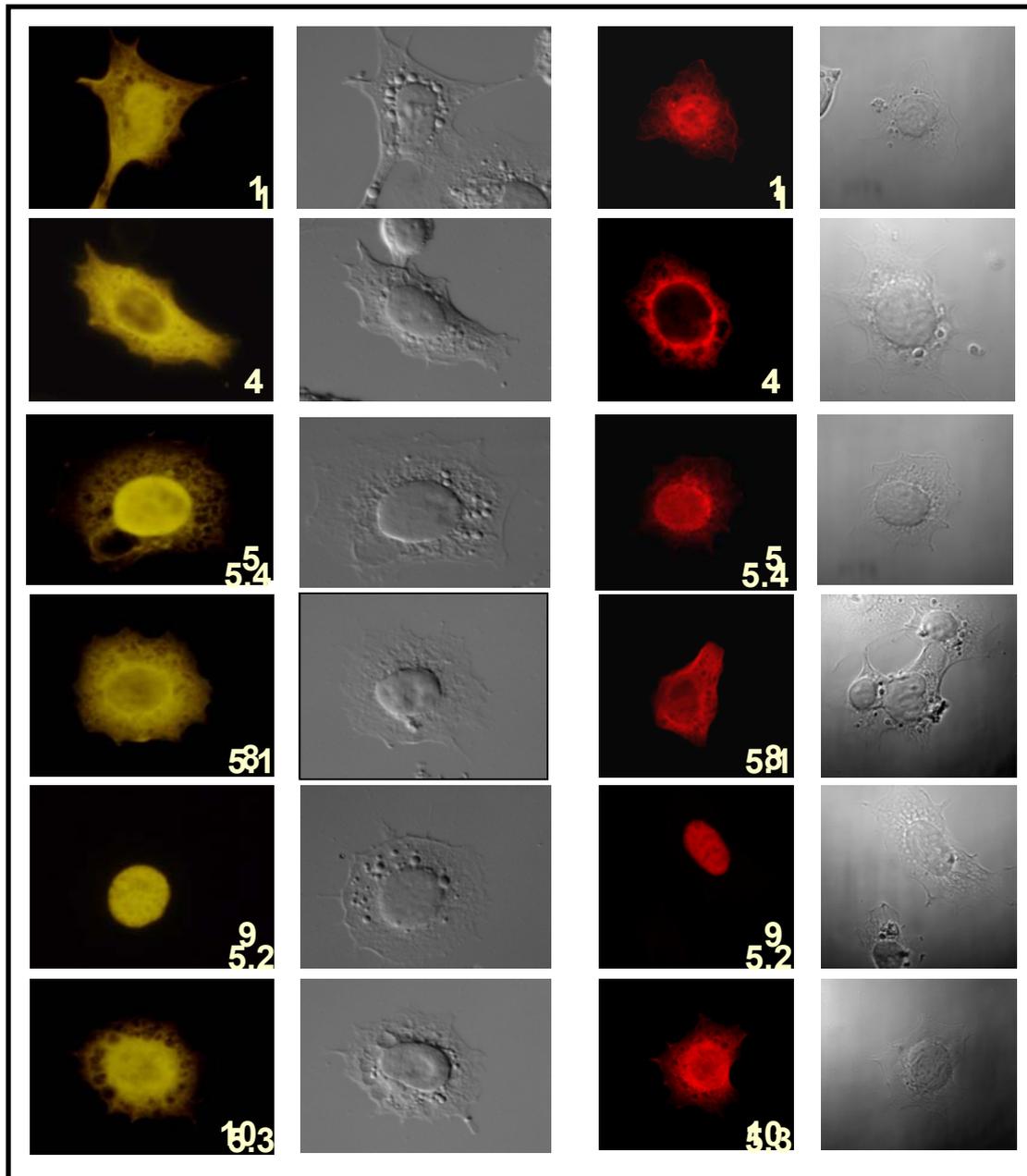


Abb. 12: Mikroskopische Analysen zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von verschiedenen Slfn-Proteinen.

NIH3T3 Fibroblasten wurden mit pCMV-myc-Plasmiden, die die komplette cDNA von individuellen Slfn-Genen enthalten, transient transfiziert und nach 24h zunächst mit dem anti-myc-mAk ($1 \cdot 9E10^{-2}$) behandelt und anschließend mit einem Cy3-konjugierten-Ziege-anti-Maus-Antikörper gefärbt (gelb: Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop; rot: Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop). Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Dr. Jens Zerrahn bereitgestellt.

Die weiterführenden Analysen fokussieren intensiv auf den Wachstums-inhibitorischen Effekt von Slfn1.

4.5 Ektopische Slfn1-Expression in verschiedenen Zellen

Die durchgeführten Proliferationsanalysen zeigten, dass eine ektopische Slfn1-Expression in NIH3T3 Fibroblasten zu einer signifikanten Verminderung des zellulären Wachstums führt. Dies könnte ein Zelltyp-spezifischer Effekt sowie eine singular Zelllinien-spezifische Beobachtung sein. Um zu überprüfen, ob eine ektopische Slfn1-Expression auch das Wachstum von anderen Zellen beeinflusst, wurden M1-Zellen (myoblastische Leukämiezelllinie 1), s.END-Zellen (Endothelzellen) und BW54 ζ 17-Zellen (Thymoma-Zelllinie) vergleichend zu NIH3T3 Fibroblasten mit dem pMSCV- und Slfn1-Retrovirus infiziert. Da die Transduktionseffizienz der verschiedenen Zelllinien sehr unterschiedlich war, konnten vergleichende Analysen erst nach FACS-vermittelter Sortierung durchgeführt werden. Gleiche Zellzahlen von transduzierten Fibroblasten wurden auf Zellkulturplatten ausgesät und für weitere 48h unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte 72h nach Transduktionsbeginn.

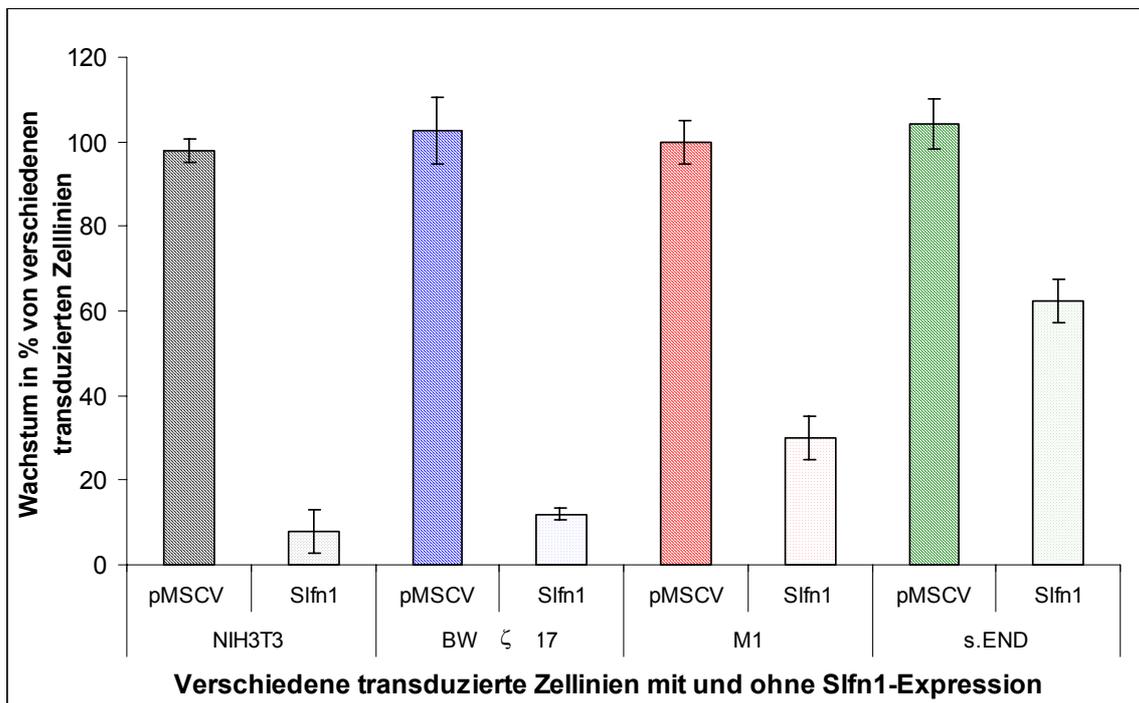


Abb. 13: Wachstumsanalysen von M1-, BW54 ζ 17-, s.END- und NIH3T3-Zellen mit und ohne Slfn1-Expression

Verschiedene Zelllinien wurden mit dem pMSCV- oder dem Slfn1-Retrovirus transduziert, 24h nach Infektion sortiert, in gleichen Zellzahlen ausplattiert und für weitere 48h kultiviert. Die Gesamtzahl der lebenden Zellen wurde 72h nach retroviraler Infektion bestimmt. Es wurde von jedem Ansatz und jeder Zelllinie Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Eine ektopische Slfn1-Expression führte auch in anderen Zellen als NIH3T3 Fibroblasten zu einer Verminderung des zellulären Wachstums. BW ζ 17-Zellen werden durch das retrovirale Slfn1-Protein im Wachstum ebenso stark eingeschränkt, wie NIH3T3 Fibroblasten. Hingegen wird die Proliferation von Slfn1-exprimierenden M1- oder s.END-Zellen ebenfalls signifikant, wenn auch weniger stark, beeinflusst. Dieses Ergebnis demonstriert, dass der wachstums-inhibitorische Effekt von Slfn1 in NIH3T3 Fibroblasten repräsentativ und kein Zelltyp-spezifischer Prozess ist. Es handelt sich vielmehr um einen Prozess der in vielen Zellen, wenn auch mit variabler Ausprägung, beobachtet werden kann. Da das Slfn1-Expressionsniveau in den individuellen Zelllinien nach Transduktion nicht bestimmt wurde, könnte eine unterschiedlich starke Slfn1-Expression in den Zelllinien vorliegen und dies der Grund für die unterschiedliche Ausprägung des wachstums-inhibitorischen Effekts sein.

4.5.1 Zellzyklus-Analysen

Aufgrund der guten Transduzierbarkeit von NIH3T3 Fibroblasten wurden weiterführende Analysen mit dieser Zelllinie durchgeführt. In dem folgenden Experiment wurde die Beziehung zwischen ektopischer Slfn1-Expression und dem Zellzyklus eingehender studiert. Wachstumsinhibition wiederum steht im engen Zusammenhang mit der Zellzykluskontrolle. Um die Beziehung zwischen ektopischer Slfn1-Expression und Inhibition des zellulären Wachstums eingehender zu untersuchen, wurden DNA-Gehalts-Analysen durchgeführt. Zellen weisen in den jeweiligen Zellzyklusphasen einen charakteristischen DNA-Gehalt auf. Zellen, die sich in der G_{0/1}-Phase des Zellzyklusses befinden, haben einen diploiden DNA-Gehalt (2n). Innerhalb der S-Phase wird der Chromosomensatz durch die DNA-Synthese von 2n auf 4n erhöht. Die Zellen, die sich in der G₂- und der mitotischen Phase befinden, zeigen einen charakteristischen DNA-Gehalt von 4n. Durch die Bestimmung des DNA-Gehalts einer Zelle können die Phasen des Zellzyklusses, in dem sich die Fibroblastenzellen während der Slfn1-Expression befinden, genauer definiert werden. Zunächst wurden NIH3T3 Fibroblasten entweder mit dem Slfn1- oder dem Kontroll-Retrovirus (pMSCV) transduziert. 24h und 48h nach Infektion wurden die GFP positiven Zellen sortiert, fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Die Bestimmung des DNA-Gehalts erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse.

Fibroblasten, die mit dem Kontrollvirus infiziert wurden und ein normales Zellwachstum zeigen, reflektieren die Zellzyklusphasen-Verteilung einer kontinuierlich proliferierenden Zellpopulation. Etwa 41,7 % der kontrollinfizierten Zellen (pMSCV), haben einen diploiden

DNA-Gehalt und befinden sich in der G₁-Phase des Zellzyklusses. Die restlichen 58% repräsentieren Zellen, die sich entweder in der DNA-Synthesephase (S-Phase) bzw. in der prä-mitotischen G₂-Phase oder in der mitotischen Phase (M-Phase) des Zellzyklusses befinden. Slfn1-exprimierende Fibroblasten zeigen im Vergleich eine signifikante Veränderung des DNA-Gehaltsprofils. Eine relative Verschiebung zugunsten von Zellen, die sich in der G₁-Phase des Zellzyklusses befinden, kann 24h nach Transduktion beobachtet werden. Etwa 69 % der Zellen wiesen einen diploiden DNA-Gehalt auf. Dementsprechend nimmt der relative Anteil von Zellen in den verbleibenden S/G₂/M-Phasen, durch die ektopische Slfn1-Expression ab.

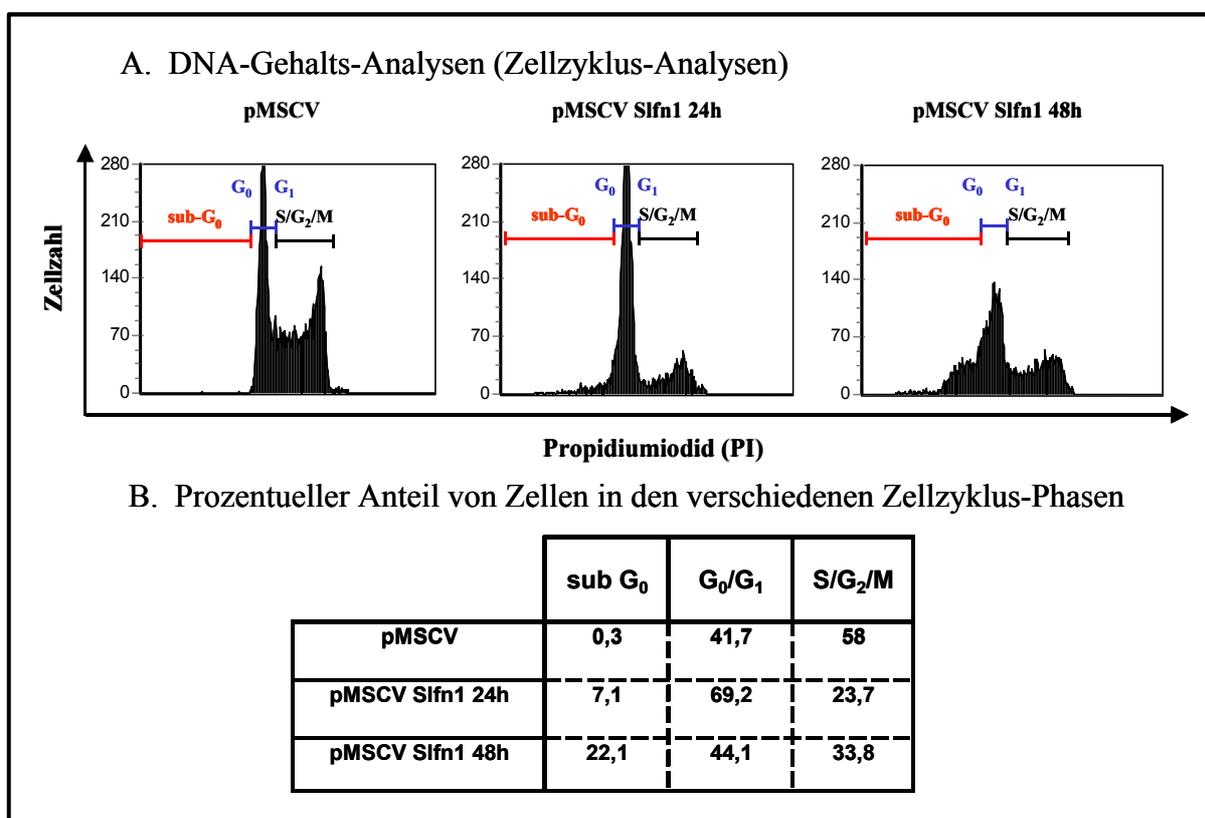


Abb. 14: DNA-Gehalts-Analysen von transduzierten NIH3T3 Fibroblasten nach verschiedenen Zeitpunkten der Slfn1-Expression

A. NIH3T3 Fibroblasten wurden entweder mit dem pMSCV- oder dem Slfn1-Retrovirus infiziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten der Infektion wurden die lebenden GFP positiven Fibroblasten sortiert, fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Der DNA-Gehalt wurde mittels FACS-Analysen bestimmt und im Histogramm-Blot dargestellt. Die Darstellungen zeigen eine Propidiumiodid-Färbung, deren Farbintensität mit dem DNA-Gehalt einer Zelle korrespondiert.

B. Tabellarische Zusammenstellung der prozentualen Anteile von Zellen mit und ohne Slfn1-Expression, die sich den verschiedenen Phasen des Zellzyklusses befinden.

Eine interessante Beobachtung ist die erhöhte Akkumulation von Zellen mit einem subdiploiden DNA-Gehalt ($n < 2$). 24h bzw. 48h nach Transduktion mit dem Slfn1-Retrovirus haben ca. 7 bzw. 22 % der Fibroblasten einen subdiploiden DNA-Gehalt. Der subdiploide DNA-Inhalt kennzeichnet den intrazellulären DNA-Abbau durch DNA-Nukleasen, die in Folge der Induktion des programmierten Zelltodes aktiviert werden.

Zusammenfassend wird deutlich, dass eine ektopische Slfn1-Expression nicht nur zu einer Wachstumsarretierung von Fibroblasten in der $G_{0/1}$ -Phase des Zellzyklusses sondern auch zu einer Akkumulation von Zellen mit subdiploidem DNA-Gehalt führt.

4.5.2 Nachweis einer Zunahme des zellulären Sterbens durch ektopische Slfn1-Expression in NIH3T3 Fibroblasten

Die DNA-Gehalts-Analysen konnten demonstrieren, dass Slfn1-exprimierende Fibroblasten zunehmend in der G_1 -Phase des Zellzyklusses akkumulieren. Sowohl durch Wachstums- als auch durch Zellzyklus-Analysen wurden erste Hinweise gefunden, dass Slfn1 an der Induktion des Zelltods beteiligt ist. Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurden erneut NIH3T3 Fibroblasten transduziert. Im ersten Experiment wurden die Fibroblasten für 8h mit dem Slfn1-Retrovirus infiziert. Im Anschluss wurden die Zellen auf eine Zellkulturplatte mit einem Glasboden übertragen und zur Bildung einer adhärenen Zellschicht für weiter 16h im 37°C Inkubator belassen. Am darauffolgenden Tag wurden Zeitrafferaufnahmen im Immunfluoreszenzmikroskop unter normalen Zellkulturbedingungen durchgeführt, die das Wachstum der transduzierten Fibroblasten im Verlauf von 12h dokumentierten. Im Abstand von 30 Sekunden wurde jeweils ein Bild in einer Auflösung von 1:40 aufgenommen, das einerseits die GFP-Expression und andererseits die morphologischen Veränderungen der transduzierten Zellen dokumentierten.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine hohe GFP-Expression in den transduzierten Zellen. Die roten Pfeile markieren Fibroblasten, die im Verlauf des Wachstums ihre Morphologie verändern. Die Zellen lösten sich zunächst aus dem Zellverband und kondensierten. Des Weiteren ist zu beobachten, dass die Fibroblasten sterben und dabei das GFP-Protein verlieren (Abb.15).

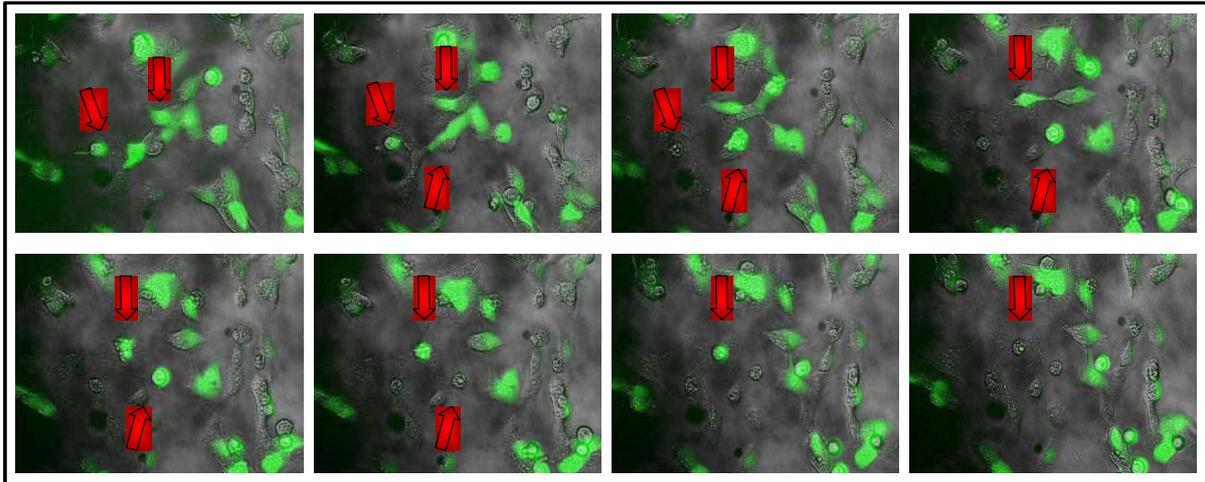


Abb. 15: Zeitrafferaufnahmen von Slfn 1-exprimierenden NIH3T3 Fibroblasten im Fluoreszenzmikroskop im Verlauf von 12h

Das Wachstum von Slfn1-transduzierten NIH3T3 Fibroblasten wurde 24h nach Beginn der Infektion unter normalen Zellkulturbedingungen für weitere 12h im Immunfluoreszenzmikroskop beobachtet. Die roten Pfeile markieren positiv transduzierte Zellen, die im weiteren Wachstumsverlauf eine veränderte Morphologie aufweisen und die in Folge der Slfn1-Expression sterben. Mit Hilfe einer Kamera (siehe Material) wurde alle 30 Sekunden ein Bild in einer Auflösung von 1:40 aufgezeichnet.

Im zweiten Experiment wurden die Fibroblasten mit dem pMSCV- oder dem Slfn1-Retrovirus infiziert. Die lebenden und toten Zellen wurden 24h, 48h und 72h nach retroviraler Infektion unter Verwendung von Trypan-Blau bestimmt.

Kontroll-transduzierte NIH3T3 Fibroblastenzellen zeigen ein normales zelluläres Wachstum und die Anzahl der toten Zellen bleibt im Zeitraum von 72h niedrig. Anders verhalten sich Fibroblasten, die Slfn1 ektopisch exprimieren. Innerhalb der ersten 24h ist kein Unterschied zwischen kontroll-transduzierte und Slfn1-exprimierenden Zellen erkennbar. Sowohl die absolute Zellzahl als auch die Anzahl von toten Zellen ist 24h nach Infektion nicht signifikant verschieden. 48h und 72h nach Transduktion wird die Wirkung der Slfn1-Expression auf das Überleben der Fibroblasten deutlich. Die Anzahl der lebenden Zellen ist im Vergleich zu den kontroll-transduzierte Zellen ca. um 40% (nach 48h) bzw. ca. um 80 % (nach 72h) geringer. Dementsprechend nimmt die Zahl der toten Zellen im Verlauf von 48h und 72h signifikant zu (Abb.16). 72h nach Beginn der Slfn1-Expression sind im gesamten Kulturansatz genauso viele tote wie lebende Zellen zu beobachten. Beide Experimente zeigen, dass eine ektopische Slfn1-Expression in NIH3T3 Fibroblasten eine Zunahme des Zelltodes einleitet.

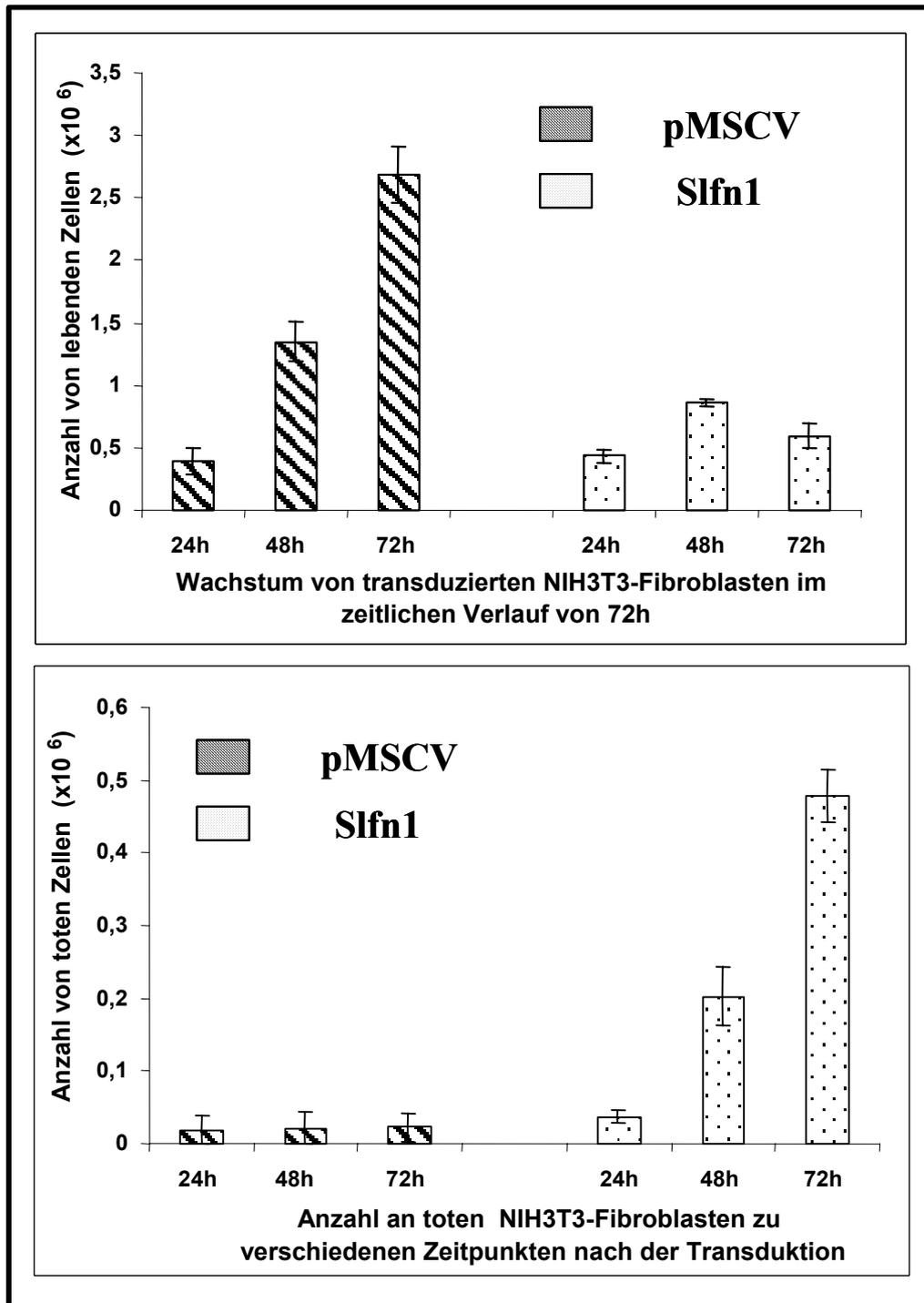


Abb. 16: Beobachtung des zellulären Wachstums von Fibroblasten mit und ohne Sln1-Expression im Verlauf von 72h

Das Wachstum von kontroll-transduzierte und Sln1-exprimierenden NIH3T3 Fibroblasten wurde im Verlauf von 72h erfasst. Dazu wurden die Fibroblasten mit dem entsprechenden rekombinanten Retroviren für jeden Zeitpunkt in dreifach Ansätzen transduziert. Unter Verwendung von Trypan-Blau wurde die Anzahl der lebenden und toten Zellen bestimmt.

4.5.3 Nachweis von Apoptose als Ursache für den Slfn1-induzierten Zelltod

Die zuvor durchgeführten Wachstumsanalysen demonstrierten, dass eine ektopische Slfn1-Expression neben der Wachstumsarretierung auch den zellulären Tod induziert. Nekrose und Apoptose sind zwei mögliche Prozesse, die den zellulären Tod verursachen können. Folgende Experimente zielen auf die Identifizierung von Mechanismen, die für den Slfn1-induzierten Zelltod verantwortlich ist. Einen ersten Hinweis, dass Slfn1 möglicherweise Apoptose in transduzierten Fibroblasten induziert, lieferten Zellzyklus-Analysen. Dort wurde 48h nach Beginn der Slfn1-Expression eine signifikante Erhöhung von Zellen mit subdiploidem DNA-Gehalt beschrieben. In den nachfolgenden Untersuchungen wurden Apoptose-spezifische Parameter analysiert. Zellen, die aufgrund endogener oder exogener Faktoren in die Apoptose eintreten, sind durch Merkmale, wie Zellschrumpfung, Blasenbildung von Membranen („membran blebbing“), Chromatinkondensation, Kernfragmentierung, Degradation des Zytoskeletts, Verlust der Membransymmetrie und –integrität, DNA-Fragmentation und durch die Exposition von Phosphatidylserin auf der Aussenseite der Plasmamembran charakterisiert (Ellis et al., 1991). Ein frühes Ereignis der Apoptose ist die Exposition von Phosphatidylserin auf der Plasmamembranaussenseite. AnnexinV ist ein Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu Phosphatidylserin (Vermees et al., 1995), dass sich daher als Nachweismolekül für apoptotische Zellen eignet.

NIH3T3 Fibroblasten wurden mit dem pMSCV- oder mit dem Slfn1-Retrovirus transduziert. 36h nach Infektion wurden die lebenden und GFP positiven Fibroblasten sortiert und mit dem Cy5-konjugierten AnnexinV-Protein gefärbt. Zur Kontrolle wurde Propidiumiodid zu den gefärbten Zellen gegeben, um bereits tote von den früh-apoptotischen Zellen differenzieren zu können. Als Positivkontrolle wurden NIH3T3 Fibroblasten mit Staurosporin behandelt, eine Substanz die Apoptose artifiziell induziert.

36h nach retroviraler Infektion sind 34,5 % der Slfn1-exprimierenden Zellen und nur 1,6 % der kontroll-transduzierte Fibroblasten (pMSCV) AnnexinV positiv. Im Vergleich dazu sind ca. 68 % der Staurosporin behandelten Fibroblasten AnnexinV positiv (Abb.17A). Die signifikante Zunahme der Bindung von Annexin V an Slfn1-transduzierten Fibroblasten demonstriert, das Phosphatidylserin erhöht an der Aussenseite der Plasmamembran in Folge einer Slfn1-induzierten Apoptose exponiert wird.

In den folgenden Experimenten sollte analysiert werden, ob der Slfn1-induzierte Zelltod von einer DNA-Fragmentierung begleitet wird. Dazu wurden NIH3T3 Fibroblasten erneut mit den

rekombinanten Retroviren, pMSCV und pMSCV-Slfn1, transduziert, die genomische DNA aus den Zellen nach 24h, 36h und 48h isoliert und im 0,8 %igem Agarose-Gel aufgetrennt.

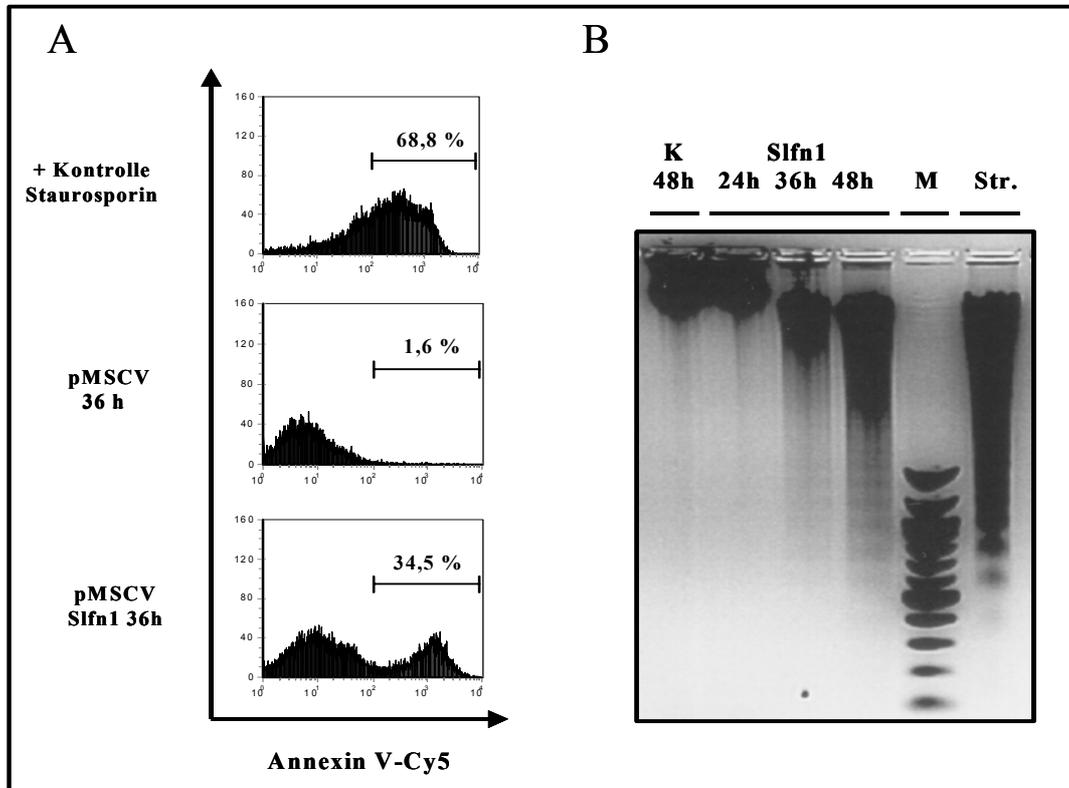


Abb. 17: Nachweis der Slfn1-induzierten Apoptose durch AnnexinV-Färbung und durch die Fragmentierung der genomischen DNA

A. NIH3T3-Fibroblasten wurden 36h nach Transduktion sortiert und mit dem Cy5-konjugierten AnnexinV-Protein gefärbt. Die Detektion von toten Zellen erfolgte unter Zugabe von Propidiumiodid (PI). Die gefärbten, transduzierten und PI-negativen Zellen wurden mittels FACS analysiert.

B. Die gesamte genomische DNA wurde von transduzierten Fibroblasten nach 24h, 36h und 48h isoliert, im 0,8%igen Agarose-Gel aufgetrennt und im Vergleich zu einem 100bp DNA-Marker dokumentiert. Als positive Kontrolle wurden in beiden Experimenten Fibroblasten für 6h mit Staurosporin behandelt und in den jeweiligen Analysen mit einbezogen. In dieser Abbildung ist die typische DNA-Fragmentierung zu erkennen. (K: Kontroll-transduzierte Fibroblasten mit dem pMSCV-Retrovirus; M: DNA-Größenstandard; Str.: Staurosporin-behandelte Fibroblasten)

Diese Analyse zeigt, dass Slfn1 die Fragmentierung der genomischen DNA 36h und 48h nach Transduktion einleitet. Die Bildung der typischen DNA-Leiter (DNA-Laddering) kann in den Staurosporin behandelten Zellen, jedoch nicht in den Kontrollzellen und auch nicht nach 24stündiger Slfn1-Expression beobachtet werden. Die charakteristische Fragmentierung der genomischen DNA in 180 bp-Fragmente und in ein Vielfaches von diesen, demonstriert, dass in Folge der ektopischen Slfn1-Expression DNA-Nukleasen aktiviert werden, die den apoptotischen Prozess vermitteln.

Durch die Zeitrafferaufnahmen in Abbildung 15 konnten Veränderungen der Morphologie und das Absterben von Fibroblasten nach ektopischer Slfn1-Expression beobachtet werden. Die dort gewählte Auflösung lässt jedoch keine genaue Beschreibung der Details der morphologischen Veränderungen zu. Um zu prüfen, ob die Slfn1-induzierte Apoptose von der Blasenbildung der Plasmamembran begleitet wird, wurden erneut Zeitrafferaufnahmen mit einer Auflösung von 1:200 durchgeführt. Dazu wurden NIH3T3 Fibroblasten für 8h mit dem Slfn1-Retrovirus infiziert. Im Anschluss wurden die Zellen auf eine Zellkulturplatte mit einem Glasboden übertragen und zur Bildung einer adhärennten Zellschicht für weitere 16h bei 37°C kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden Zeitrafferaufnahmen im Immunfluoreszenzmikroskop unter normalen Zellkulturbedingungen durchgeführt, die das Wachstum der transduzierten Fibroblasten im Verlauf von 6h dokumentierten. Im Abstand von 30 Sekunden wurde jeweils ein Bild in einer Auflösung von 1:200 aufgenommen, das einerseits die GFP-Expression und andererseits die morphologischen Veränderungen der transduzierten Zellen dokumentierten.

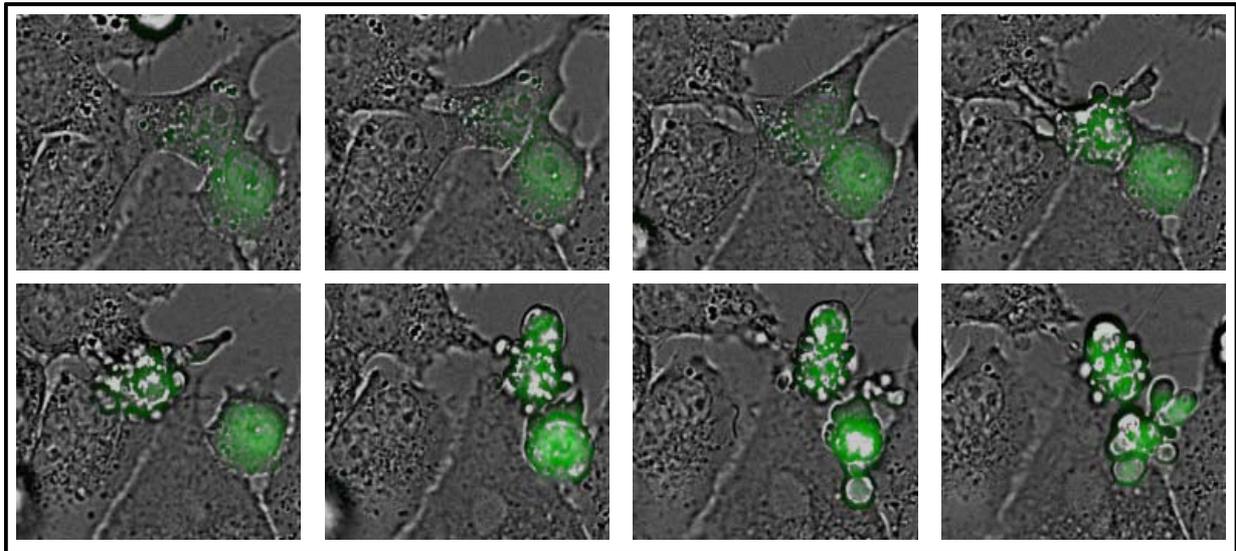


Abb. 18: Zeitrafferaufnahmen zur Darstellung der veränderten Morphologie von Slfn1-exprimierenden NIH3T3 Fibroblasten

NIH3T3 Fibroblasten wurden mit dem Slfn1-Retrovirus transduziert und nach 24h im Fluoreszenzmikroskop unter normalen Zellkulturbedingungen für weiter 6h beobachtet. Mit Hilfe einer Kamera (siehe Material) wurde alle 30 Sekunden ein Bild in einer Auflösung von 1:200 aufgezeichnet. In den immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ist zu erkennen, dass Slfn1-exprimierende Fibroblasten, die für die Apoptose typischen morphologischen Veränderungen zeigen.

In Abb. 18 sind zwei GFP⁺ transduzierte Fibroblastenzellen zu sehen, die in Folge der Slfn1-Expression Apoptose-spezifische morphologische Veränderungen erfahren. In den frühen Stadien der Apoptose lösten sich die transduzierten Zellen vom Zellverband und verringerten dabei ihre Zellgröße. Im weiteren Verlauf der Apoptose kam es zur Bildung von blasenförmigen Ausstülpungen der Plasmamembranen, ein Phänomen, das als „membran blebbing“ bezeichnet wird.

Die Ergebnisse der drei Experimente zeigen deutlich, dass eine retrovirale Slfn1-Expression in Fibroblasten Apoptose induziert. Die Apoptose wird begleitet durch die Fragmentierung der genomischen DNA, durch Exposition von PS an die Plasmamembranaussenseite und von spezifischen morphologischen Veränderungen, wie die Blasenbildung der Plasmamembran.

4.5.3.1 Nachweis der Beteiligung von Caspasen an der Slfn1-induzierten Apoptose

Die Zellzyklus-Analysen, die AnnexinV-Färbungen, die genomische DNA-Fragmentierung und die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen demonstrieren, dass die ektopische Slfn1-Expression in NIH3T3 Fibroblasten Apoptose induziert. Der apoptotische Prozess wird durch eine Vielzahl von molekularen Mechanismen induziert und reguliert. Caspasen, eine Familie von Cystein-Proteasen, sind ebenso bedeutende Vermittler des programmierten Zelltods, wie einige Elemente des MAPK-Signalweges. Die p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) beispielsweise ist an Signaltransduktionskaskaden beteiligt und ein potenter Induktor der Apoptose (Merritt et al., 2000). In den folgenden Experimenten wurde überprüft, ob Caspasen an der Slfn1-induzierten Apoptose beteiligt sind. Dazu wurde im ersten Experiment ein mit FITC-konjugierter Caspase-Inhibitor verwendet. Der Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK-FITC ist in der Lage in die Zellen einzudringen, sich mit den aktiven Zentren der Caspasen zu verbinden und deren Aktivität irreversibel zu inhibieren. Die Interaktion des FITC-konjugierten Inhibitors mit der aktiven Caspase wird durch FACS-Analysen nachgewiesen. Da der FITC-Farbstoff und das GFP-Protein in den FACS-Analysen ähnliche Emissionsspektren haben, eignen sich die Retroviren, die neben dem Slfn1-Protein auch das GFP-Protein exprimieren, nicht für die retrovirale Infektion der Fibroblastenzellen. Aus diesem Grund wurde das GFP-Gen aus den retroviralen Vektoren pMSCV2.2-IRES-GFP und pMSCV-Slfn1 deletiert, um somit rekombinanter Retroviren generieren zu können, die nach Transduktion der Fibroblasten nur das Slfn1-Protein und nicht das GFP-Protein exprimieren können. Die rekombinanten Slfn1-Retroviren (-GFP) wurden für die Transduktion der

NIH3T3 Fibroblasten verwendet. 48h nach Infektion wurden die transduzierten bzw. die Staurosporin-behandelten Zellen mit dem Z-VAD-FMK-FITC-Inhibitor gefärbt und mittels FACS analysiert.

Fibroblastenzellen, die nicht oder mit dem Kontrollvirus behandelt wurden, zeigen eine geringfügige Fluoreszenz. Nach synchroner Caspaseaktivierung durch Staurosporin sind die behandelten Fibroblasten nahezu alle FITC positiv. In 28 % der Slfn1-exprimierenden Fibroblasten kann eine Interaktion des FITC-konjugierten Inhibitors mit aktiven Caspasen nachgewiesen werden (Abb. 19). Dieses Ergebnis gibt einen ersten Hinweis auf die Beteiligung von Caspasen an der Slfn1-induzierten Apoptose.

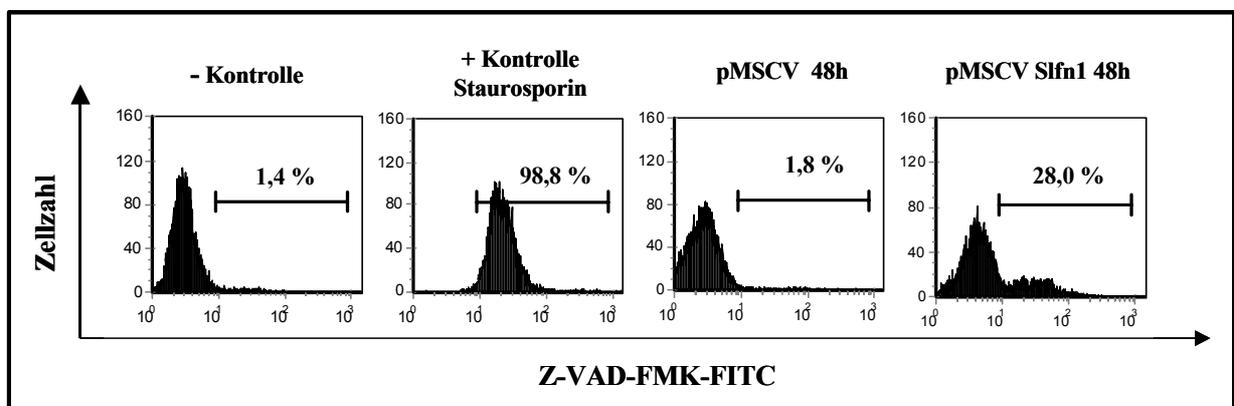


Abb. 19: Durchflusszytometrische Analysen zum Nachweis von aktiven Caspasen in Slfn1-exprimierenden Fibroblasten

NIH3T3 Fibroblasten wurden mit pMSCV- oder Slfn1-Retroviren (ohne GFP) behandelt und nach 48h mit dem FITC-konjugierten Caspase-Inhibitor gefärbt. Als Kontrolle für den Nachweis von aktiven Caspasen wurden NIH3T3 Fibroblasten für 6h mit Staurosporin behandelt und in gleicher Weise mit dem Inhibitor gefärbt. Als Negativkontrolle wurden nicht oder kontroll-infizierte Zellen verwendet.

Um zu prüfen, ob Elemente des MAPK-Signalweges, wie die p38 MAPK, an der Slfn1-induzierten Apoptose beteiligt sind, wurde überprüft, welchen Einfluss die Inhibition von Caspasen und der p38-MAPK auf das Überleben von Slfn1-exprimierenden Fibroblasten hat. Nach 8stündiger Infektion der NIH3T3 Fibroblasten mit dem pMSCV- oder Slfn1-Retrovirus (mit GFP) wurden die jeweiligen Inhibitoren (Caspase-Inhibitor: z-VAD-FMK bzw. p38 MAPK-Inhibitor: SB203580) zu den Zellen gegeben. Die Anzahl der lebenden und toten Zellen wurde nach 72stündiger Kultivierung bestimmt. Da die Inhibitoren in DMSO gelöst waren, wurde zu kontroll-transduzierte Fibroblasten gleiche Mengen DMSO gegeben. Dieser Ansatz diente als Kontrolle, um zu testen, ob das DMSO in den eingesetzten Mengen einen Einfluss auf das Überleben der Fibroblasten hat.

Dieses Experiment zeigt deutlich, dass der Einsatz von Caspase- bzw. von p38 MAPK-Inhibitoren, die Slfn1-induzierte Apoptose inhibiert. Die Anzahl lebender Zellen ist nach Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor um 44% und nach Einsatz des p38 MAPK-Inhibitor um 33%, im Vergleich zu nicht behandelten Slfn1-exprimierenden Fibroblasten, erhöht. Zu erkennen ist des Weiteren, dass die Zugabe von DMSO zu den Kontroll-infizierten Zellen zu einer Verminderung des Überlebens ca. um 10% führt (Abb.20). In den vorherigen Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Infektion mit dem Kontrollvirus keinen Einfluss auf das Wachstum oder das Überleben von Fibroblasten hatte, so dass die leicht verringerte Anzahl lebender Zellen auf den Einsatz und die Wirkung von DMSO zurückzuführen ist.

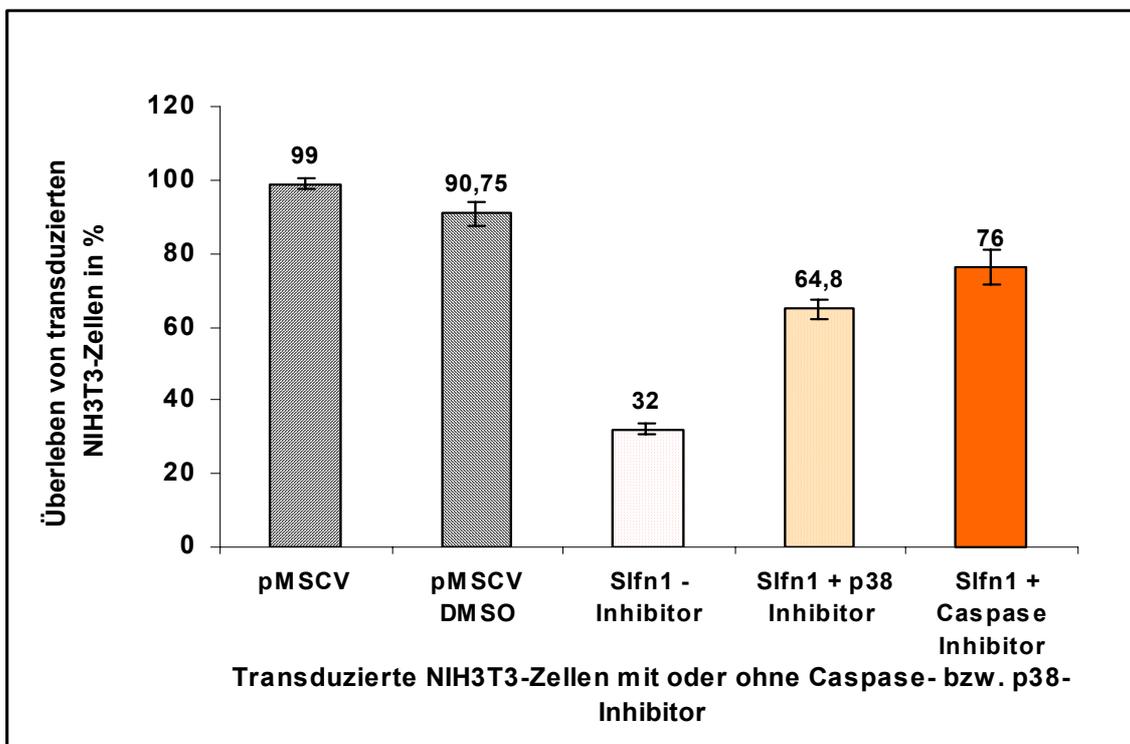


Abb. 20: Anzahl lebender Zellen von Slfn1-exprimierenden Fibroblasten nach Behandlung mit Caspase- oder p38 MAPK-Inhibitoren

NIH3T3 Fibroblasten wurden mit Slfn1-Retroviren transduziert und mit einem Caspase- bzw. p38 MAPK-Inhibitor behandelt. Der prozentuale Anteil von lebenden Zellen wurde 72h nach Infektion überprüft. Als Negativkontrolle wurden Fibroblasten mit dem pMSCV-Retrovirus infiziert und wahlweise mit der gleichen Menge an DMSO versetzt, wie sie bei den Inhibitorlösungen zu finden sind. Als Positivkontrolle wurden die Fibroblasten nur mit dem Slfn1-Retrovirus behandelt. In zwei unabhängigen Experimenten wurden von jedem Ansatz Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Bestimmung der lebenden und toten Zellen erfolgte durch Verwendung von Trypan-Blau.

Dennoch ist auffällig, dass die Gesamtzellzahl der Inhibitor behandelten Slfn1-exprimierenden Fibroblasten im Vergleich zu Slfn1-exprimierenden Zellen ohne Inhibitor-Behandlung, nicht erhöht ist (Abb.21). Durch den Einsatz des Caspase-Inhibitors überleben ca. 76 % und durch den p38 MAPK-Inhibitor ca. 65 % der Slfn1-exprimierenden Fibroblasten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die apoptotische Wirkung von Slfn1 in NIH3T3 Fibroblasten durch den Einsatz der beiden Inhibitoren zwar blockiert werden kann, der Wachstums-inhibitorische Effekt jedoch erhalten bleibt. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die p38 MAP-Kinase und die Caspasen einen wesentlichen Anteil an der Exekution Slfn1-induzierte Apoptose haben.

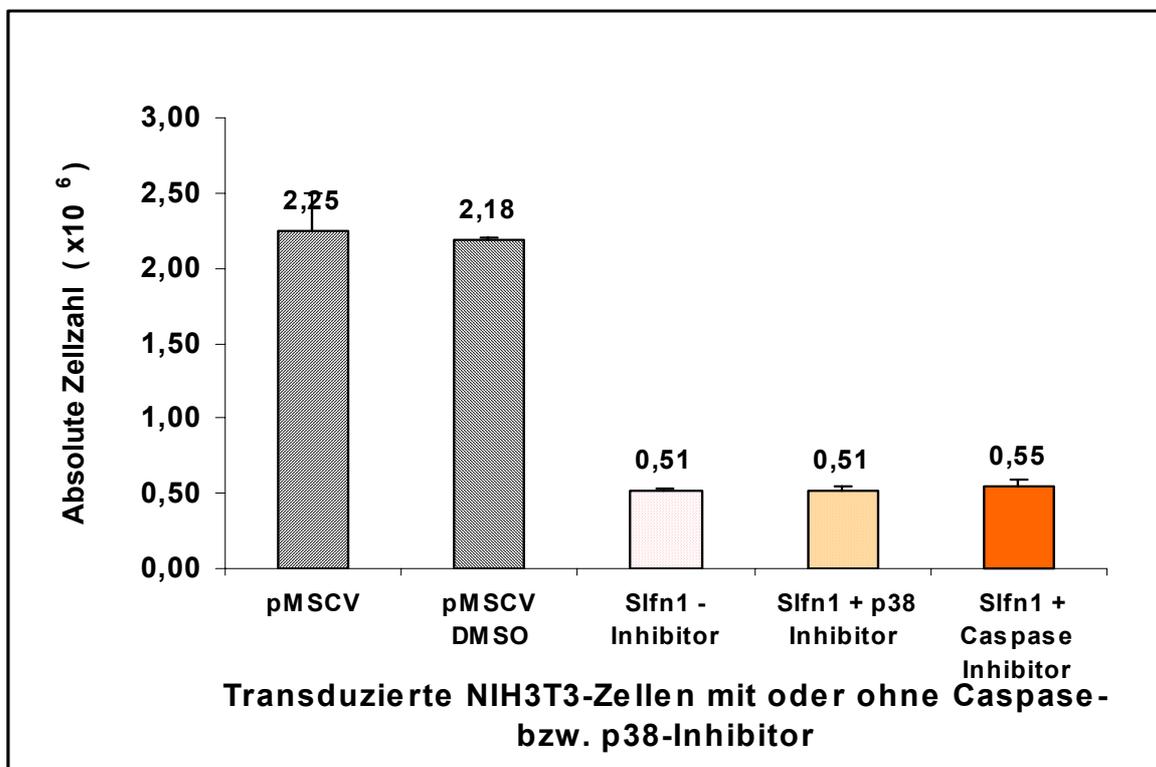


Abb. 21: Darstellung der absoluten Zellzahlen von Slfn1-exprimierenden Fibroblasten mit und ohne den Einsatz von Caspase- und p38 MAPK-Inhibitoren

Das Diagramm zeigt die Summe der lebenden und toten Zellen, die mit dem pMSCV- bzw. dem Slfn1-Retrovirus infiziert und dann entweder mit dem Caspase- oder p38 MAPK-Inhibitor behandelt wurden. Als Negativkontrolle wurden Fibroblasten mit dem pMSCV-Retrovirus infiziert und mit der gleichen Menge an DMSO versetzt, wie sie bei den Inhibitorlösungen zu finden sind. Als Positivkontrolle wurden die Fibroblasten nur mit dem Slfn1-Retrovirus behandelt. In zwei unabhängigen Experimenten wurden von jedem Ansatz Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Bestimmung der lebenden und toten Zellen erfolgte durch Verwendung von Trypan-Blau.

4.5.3.2 Transkriptom-Analysen

Durch die bisherigen Experimente wurde deutlich, dass eine ektopische Slfn1-Expression die Proliferation von transduzierten Fibroblasten inhibiert und im weiteren Wachstumsverlauf den Prozess der Apoptose einleitet, an denen Caspasen und ein p38 MAPK-abhängiger Reaktionsweg beteiligt sind. Caspasen und die p38-MAPK werden ebenfalls durch differentielle molekulare Mechanismen aktiviert bzw. reguliert. Um weitere Informationen über die molekularen Mechanismen und Reaktionswege der Slfn1-induzierten Wachstumsarretierung und der Caspase- und p38 MAPK-vermittelten Apoptoseinduktion zu bekommen, wurden Transkriptom-Analysen durchgeführt. Das Ziel dieser Analysen ist die Identifizierung von Molekülen oder Mechanismen, die an der Slfn1-induzierten Wachstumsarretierung und Apoptose beteiligt sind. Im ersten Experiment wurden DNA-Microarray-Analysen durchgeführt. Dazu wurden erneut NIH3T3 Fibroblasten mit dem pMSCV- bzw. dem Slfn1-Retrovirus infiziert. 24h und 48h nach Transduktion wurde die RNA von sortierten lebenden GFP positiven Fibroblastenzellen für die Transkriptom-Analysen isoliert. Es wurde das Genexpressionsprofil von Kontroll-infizierten (pMSCV) und Slfn1-exprimierenden Fibroblasten nach den jeweiligen Zeitpunkten (pMSCV vs. pMSCV-Slfn1 nach 24h bzw. pMSCV vs. pMSCV-Slfn1 nach 48h) verglichen. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über den wesentlichen Teil der Gene, die in Folge der ektopischen Slfn1-Expression differentiell exprimiert werden.

Es ist auffällig, dass insbesondere Gene, die in Verbindung mit der ER-Stress-Antwort, der ungefalteten Proteinantwort (UPR), der Apoptose, der Zellzyklus- und der Wachstumskontrolle stehen, differentiell reguliert werden. Interessanter Weise sind eine Vielzahl von Genen, die eine bedeutende Rolle bei der ER-Stress-Antwort (CA-VI, Gadd153, Ndr1, Osi, Gadd45a, c-myc, Nfil3, Slugh oder Jund1) und/oder der Apoptose (Ets2) einnehmen, bereits 24h nach Beginn der Slfn1-Expression hochreguliert. Deren Expression erhöht sich sogar nach weiteren 24h. Dem gegenüber stehen Gene, die in Folge von Slfn1, nach 48h eine signifikante Verminderung der Expression aufweisen. Insbesondere Gene, die für Signaltransduktionwege (Rock2, MAP4KI), für die Zellzykluskontrolle (CDC25C, p19^{ARF}) und/oder der Proliferation (ECT2, IGFBP7) verantwortlich sind, werden 48h nach retroviraler Slfn1-Infektion signifikant vermindert exprimiert (Abb.22). Besonders die ID1-4-Gene, die für die Progression durch den Zellzyklus und damit für das Wachstum notwendig sind, werden durch Slfn1 vermindert exprimiert.

Name(n)	Beschreibung des Genes	Accession #	Expressionsfaktor 24h	Expressionsfaktor 48h	Funktion
CA-VI	carbonic anhydrase	NM_009802	5,77	7,93	ER-Stressantwort / UPR
CHOP/GADD153	C/EBP-homologous protein	NM_007837	3,83	4,87	ER-Stressantwort / UPR
GADD45α	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	NM_007836	6,19	4,69	ER-Stressantwort / UPR
Ets2	E26 avian leukaemia oncogene 2	BE132745	2,88	4,53	Apoptose / Stress
Sqstm1, Osi	sequestosome, oxidative stress induced	NM-011018	2,57	4,28	ER-Stressantwort / UPR
MDM2	transformed mouse 3T3 cell double minute 2	NM_010786	1,89	4,09	Apoptose / Stress
Ndr1, RTP, Drg1	N-myc downstream regulated 1	NM_010884	3,3	5	ER-Stressantwort / UPR
MDM2	transformed mouse 3T3 cell double minute 2	AK004719	1,82	3,83	Apoptose / Stress
B7-1, CD80	CD80 antigen	X60958	2,71	3,2	ER-Stressantwort / UPR
IEX1, IER3	immediate early response gene X-1	X67644	1,98	3,06	ER-Stressantwort / UPR
IFT203	interferon activated gene 203	NM_880328	1,44	2,89	ER-Stressantwort / UPR
IFT202b	interferon activated gene 202b	NM_011940	1,51	2,84	ER-Stressantwort / UPR
NEDD9, MEF1	EST, similar to mouse enhancer of filamentation 1	BE554490	1,93	2,82	Apoptose / Stress
IFT202a	interferon activated gene 202A	NM_08327	1,49	2,77	ER-Stressantwort / UPR
VEGFc	vascular endothelial growth factor	NM_009506	1,61	2,63	ER-Stressantwort / UPR
BiP, GRP78, Hspa5	heat shock 70kD protein 5 (glucose regulated protein (78kD))	M19351	2,15	2,59	ER-Stressantwort / UPR
Cdkn1a, p21^{WAF}	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)	BB261613	1,98	2,51	ER-Stressantwort / UPR
osteopontin, SPP1	secreted phosphoprotein 1, early T-lymphocyte activation 1	NM_009263	1,58	2,48	ER-Stressantwort / UPR, Apoptose / Stress
Cdkn1a, p21^{WAF}	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)	NM_007669	1,94	2,39	ER-Stressantwort / UPR
osteopontin, SPP1	secreted phosphoprotein 1, early T-lymphocyte activation 1	AI875606	1,52	2,35	ER-Stressantwort / UPR, Apoptose / Stress
Prss15, LON	protease, Ser, 15	AW4131155	1,62	2,33	ER-Stressantwort / UPR
Hspbap1	EST, similar to rat PASS1	AI642661	1,4	2,29	Apoptose / Stress
c-myc	myelocytomatosis oncogene	NM_010849	2,58	2,26	ER-Stressantwort / UPR
PDCD2	programmed cell death 2	NM_008799	1,4	2,21	Apoptose / Stress
CRCP	calcitonin gene-regulated peptide-receptor component protein	NM_007761	1,35	2,18	
Sema3c	semaphoring 3C	NM_013657	2,2	2,14	Apoptose / Stress
IFI204	interferon activated gene 204	NM_008329	1,37	2,12	ER-Stressantwort / UPR
NFI3/E4BP4	nuclear factor, interleukin 3, regulated	NM_017373	2,74	2,11	ER-Stressantwort / UPR
NGFb	nerve growth factor, beta	NM_013609	1,79	2,08	Apoptose / Stress
ELAVL2	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2	NM_010486	1,34	2,05	Apoptose / Stress
FLIZ1	zinc finger protein FLIZ1	NM_020594	1,71	2,04	Apoptose / Stress
CLK4	cdc2/CDC28-like-kinase 4	AF005423	1,81	2,04	Zellzyklus

MDRLA	EST, p-glycoprotein	AI450248	2,63	2,02	ER-Stressantwort / UPR
STAF	selenocysteine tRNA gene transcription activating factor	NM_009281	1,58	2	ER-Stressantwort / UPR
4F2, CD98, Mdu1	CD98	NM_008577	1,95	1,95	ER-Stressantwort / UPR
SLUG	slug, chicken homolog	NM_011415	2,37	1,85	ER-Stressantwort / UPR
SNK	serum-inducible-protein	M96163	2,24	1,82	Apoptose / Stress
JUND 1	Jun proto-oncogene related gene d1	NM_010592	2,81	1,64	ER-Stressantwort / UPR, Apoptose / Stress
GDF15	growth differentiation factor	NM_011819	2,54	1,51	Apoptose / Stress
ATF4	activating transcription factor 4	NM_009716	1,67	1,5	ER-Stressantwort / UPR
PTGS2, COX2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	NM_011198	2,24	1,37	Apoptose / Stress
ANXA1	Annexin 1	NM_010730	-1,42	-2,05	
MAP4K1	mitogen activated protein kinase kinase kinase kinase 1	BB497460	-1,53	-2,09	Signaltransduktion
ROCK2	Rho-associated coiled-coil forming kinase 2	NM_009072	-1,04	-2,1	Signaltransduktion
MAP4K1	mitogen activated protein kinase kinase kinase kinase 1	BB443551	-1,45	-2,13	Signaltransduktion
CDC25C	cell division cycle 25 homolog	NM_009860	-1,21	-2,3	Zellzyklus
ECT2	ect 2 oncogene	NM_007900	-1,05	-2,32	Wachstum
IGFBP7	insulin like growth factor binding protein 7	NM_008048	1,08	-2,35	Wachstum
SIPA1	signal.induced proliferation associated gene 1	NM_011379	-1,42	-2,37	Signaltransduktion
EGR1	early growth response 1	NM_007913	1,01	-2,4	Apoptose / Stress
p19^{ARF}	cyclin dependent kinase inhibitor 2D	NM_009878	-1,42	-2,44	Zellzyklus
ID4	Inhibitor of DNA binding4	X75018	-1,42	-3,06	Zellzyklus
CAMK2b	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta	NM_007595	-1,65	-3,2	Signaltransduktion
FIGF, VEGFD	c-fos induced growth factor, vascular endothelial growth dactor d	NM_010216	-1,86	-3,44	Wachstum
ID2	Inhibitor of DNA binding2	NM_010496	1,08	-3,73	Zellzyklus
ID1	Inhibitor of DNA binding1	M31855	-1,29	-4,25	Zellzyklus
ID3	Inhibitor of DNA binding3	NM008321	-1,22	-4,51	Zellzyklus

Abb. 22: Tabellarische Darstellung von Genen, die in Folge der ektopischen Slfn1-Expression in NIH3T3 Fibroblasten reguliert werden

Microarray-Expressionsanalysen wurden von Kontroll-infizierten und Slfn1-exprimierenden Fibroblasten 24h bzw. 48h nach Transduktion durchgeführt. In der Tabelle sind die abgekürzten Namen und deren englische Bezeichnungen, sowie die Faktoren, die die veränderte Genexpression 24h und 48h nach Transduktion beschreiben, dargestellt. Die Darstellung gibt einen Einblick über die Gene, die in Folge von Slfn1-Expression reguliert sind.

Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass Slfn1 in der ER-Stressinduktion involviert sein könnte. Die Bedeutung der differentiellen Expression anderer Gene ist in Bezug auf den Slfn1-induzierten Phänotyp nicht bekannt.

4.5.3.3 Quantitative PCR-Analysen

Durch die Microarray Transkriptom-Analysen konnten Hinweise gefunden werden, dass in Folge der ektopischen Slfn1-Expression zahlreiche Gene differentiell reguliert werden, die eine regulative Funktion in der ER-Stress-Antwort, in der UPR (Unfolded Protein Response: ungefalteten Proteinantwort), im zellulären Stress, in der Zellzykluskontrolle und in der Apoptose übernehmen. Es gibt eine Reihe von weiteren Faktoren, die ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Regulation der Apoptose und der Wachstumskontrolle spielen. Das p53-Tumorsuppressor-Protein und die Mitglieder der Bcl-2-Familie sind wichtige Regulatoren des Zellzyklusses, der Proliferation und der Apoptose. Sowohl die Genexpression von einigen Mitgliedern der Bcl-2-Familie, als auch die Expression von p53 und von einigen ER-Stress-spezifischen Genen wurde durch quantitative PCR-Analysen überprüft.

Die RNA von pMSCV- und Slfn1-transduzierten Fibroblasten wurde 24h, 36h und 48h nach retroviraler Infektion isoliert, in cDNA umgeschrieben und für die quantitativen PCR-Analysen verwendet.

Die quantitativen PCR-Analysen können die Ergebnisse der Microarray-Analysen im wesentlichen bestätigen. Im Verlauf von 24h, 36h und 48h werden die ER-Stress-spezifischen Gene (Gadd45a, Gadd153, CarbAnh6, c-myc, Ndr1, Nfil3, Slugh und Jund1) verstärkt exprimiert. Besonders das Genexpressionsniveau von Gadd45 α steigt 48h nach Slfn1-Transduktion um den Faktor 116 und von CarbAnh6 um den Faktor 397. Auch die proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie werden im Verlauf der Slfn1-Expression hochreguliert. Besonders Bax scheint mit einer Expressionserhöhung um den Faktor 18,9 ein mögliches Molekül, das an der Slfn1-induzierten Apoptose beteiligt sein könnte. Kritisch ist jedoch zu betrachten, dass auch die Expression der antiapoptotischen Mitglieder, wie Bcl-2 und Bcl-XL, zunimmt. Die relative Zunahme ist jedoch nicht so hoch, wie die der proapoptotischen Bcl-2-Mitglieder. Eine mögliche Beteiligung von p53 an der Slfn1-induzierten Apoptose ist durch die Expressionserhöhung um den Faktor 9 nicht auszuschließen (Abb. 23). Insofern demonstrieren sowohl die quantitativen PCR- und die Microarray-Analysen, dass das ektopisch exprimierte Slfn1-Protein in NIH3T3 Fibroblasten

insbesondere Gene reguliert, die in Verbindung mit der ER-Stressantwort und der Apoptose stehen.

Gen-Funktion	Gen	pMSCV-slf1	pMSCV-slf1	pMSCV-slf1
		24h	36h	48h
ER-Stress				
	Gadd153	7	9	30
	CarbAnh6	22	79	397
	c-Myc	1	2	12
	Ndr1	6	8	31
	Nfil3	9	11	22
	Slugh	6	9	11
	Jund1	6	7	20
Bcl-2 Familie				
antiapoptotisch	Bcl-X _L	1,1	2,4	2,7
	Bcl-2	1,3	1,3	2,5
proapoptotisch	BAK	2,0	4,1	7,1
	BAD	1,8	3,5	7,3
	BAX	3,9	9,3	18,9
Zellzykluskontrolle und Apoptose				
	p53	1,4	4,5	9
	p21 ^{WAF/CIP}	3,1	2,3	7,8

Abb. 23: Tabellarische Darstellung von Slfn1-regulierten Genen in transduzierten NIH3T3 Fibroblasten

Die cDNA von Kontroll-infizierten und Slfn1-exprimierenden Fibroblastenzellen wurde für RT-PCR-Analysen verwendet. Dazu wurden NIH3T3 Fibroblasten transduziert, die GFP-exprimierenden Zellen 24h, 36h und 48h nach Infektion sortiert und die mRNA aus den Zellen isoliert. Nach der cDNA-Synthese wurde die RT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer durchgeführt. Als interner Standard wurde die Amplifikation von β -Aktin oder GAPDH überprüft. Die dargestellten Zahlen definieren den Faktor, um den die Genexpression von Slfn1-exprimierenden Fibroblasten verändert ist. Die Amplifikation von jedem Gen wurde in Dreifachansätzen in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

4.6 Nachweis einer Slfn1-vermittelten ER-Stressantwort

Durch quantitative PCR- und Microarray-Analysen konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass das ektopisch exprimierte Slfn1-Protein möglicherweise an der Induktion von ER-Stress beteiligt ist. Der Transkriptionsfaktor Xbp1 (X-Box bindendes Protein 1) wird durch ER-Stress modifiziert und dadurch aktiviert. Das Spleissen der Xbp1-mRNA führt zur Bildung des aktiven Xbp-1-Proteins, welches die ER-Stressantwort und die UPR effizient vermittelt (Lee et al., 2000; Ruegsegger et al., 2001; Tirasophon et al., 2000; Yoshida et al., 2001). Der Nachweis der Prozessierung der Xbp-1 mRNA ist daher ein spezifisches Indiz für

die Induktion einer ER-Stressantwort. Aus diesem Grund wurde der Status der Xbp-1 mRNA in Slfn1-exprimierenden Fibroblasten analysiert

NIH3T3-Fibroblasten wurden mit dem pMSCV- oder dem Slfn1-Retrovirus transduziert, die GFP-exprimierenden Zellen nach 24h, 36h und 48h sortiert, die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese den PCR-Analysen unterzogen. Als Kontrolle wurden NIH3T3-Zellen für 1h, 3h und 5h mit Thapsigargin behandelt, ein Inhibitor der ER-spezifischen Calcium ATPase, welcher effektiv ER-Stress induziert.

In Thapsigargin behandelten Fibroblasten wird die mRNA von Xbp-1 innerhalb von einer Stunde nahezu vollständig prozessiert. Die nicht-prozessierte Form der Xbp-1 mRNA ist in den Kontroll-infizierten (pMSCV) Fibroblasten bzw. in den Zellen ohne Zugabe von Thapsigargin (0d) zu finden. In Slfn1-exprimierenden Zellen kann das Xbp-1 Spleissprodukt bereits 24h nach Transduktion detektiert werden. Innerhalb von 36h-48h wird die Xbp-1 mRNA in Slfn1-exprimierenden Fibroblasten besonders effektiv prozessiert. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die ektopische Slfn1-Expression in NIH3T3 Fibroblasten in Verbindung mit der ER-Stressantwort steht.

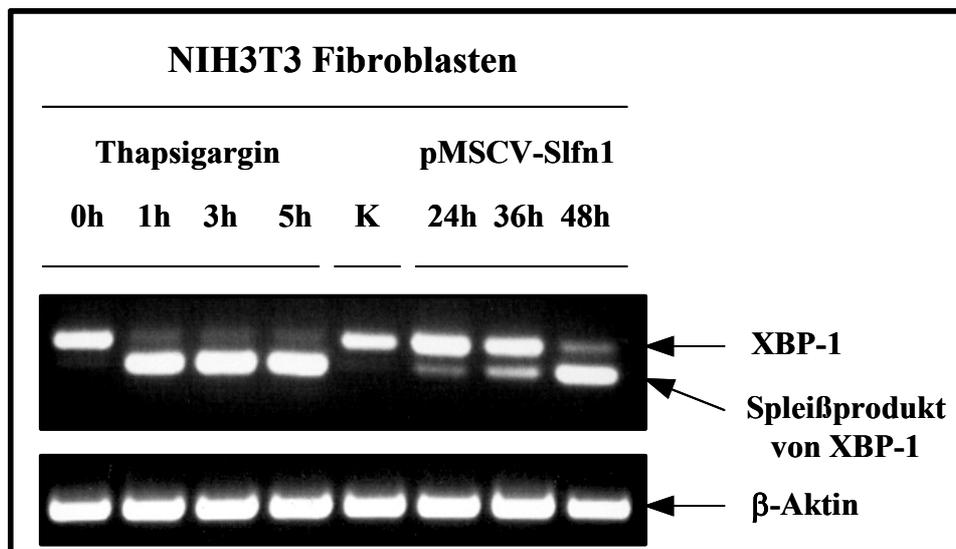


Abb. 24: Nachweis einer Slfn1-induzierten ER-Stressinduktion

Die mRNA von Slfn1-exprimierenden und von Thapsigargin-behandelten NIH3T3-Fibroblasten wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und für PCR-Analysen verwendet. Als Negativkontrollen wurde die mRNA von Thapsigargin-unbehandelten und Kontroll-infizierten Fibroblasten isoliert und ebenfalls in den PCR-Analysen überprüft. Die Amplifikation von β -Aktin wurde parallel durchgeführt, um gleiche Mengen an eingesetzter cDNA sicherzustellen. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden in einem 2%igen Agarose-Gel separiert und dokumentiert.

Die in vitro durchgeführten Analysen zeigen, dass das Slfn1-Protein mit dem kompletten amino-terminalen Bereich eine Proliferations-inhibitorische Funktion besitzt. Besonders der amino-terminale Bereich von Slfn1 scheint für die Umsetzung der Wachstumsarretierung und damit für den Austritt aus dem Zellzyklus von essentieller Bedeutung zu sein. Die ektopische Expression von Slfn1 induziert nicht nur in NIH3T3 Fibroblasten, sondern auch in anderen Zelllinien ein Proliferationsstop. Innerhalb von 24h bewirkt die retrovirale Slfn1-Expression in transduzierte Fibroblasten eine ausgeprägte Arretierung in der G₁-Phase des Zellzyklusses. Im weiteren Verlauf der Slfn1-Expression wird der Zelltod eingeleitet, der auf dem Prozess der Apoptose zurückzuführen ist. An der Slfn1-vermittelten Apoptoseinduktion sind Caspasen und die p38 MAPK involviert. Slfn1 ist ebenfalls an der Regulation von Genen beteiligt, die mit der ER-Stressantwort, mit der Apoptose und mit der Zellzykluskontrolle in Verbindung stehen. Die Prozessierung der Xbp-1-mRNA zeigt das Slfn1 an der Induktion einer ER-Stressantwort beteiligt ist. Die Initiation des ER-Stresses in der frühen Phase der Slfn1-Expression ist wahrscheinlich der Grund für die Arretierung der Fibroblasten in der G₁-Phase des Zellzyklusses und für die Einleitung des apoptotischen Prozesses.