

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurochirurgie
des Universitätsklinikums Halle (Saale)
(Direktor: Professor Dr. med. Christian Strauss)

**Molekulare Antagonisierung von *minichromosome maintenance* Protein 3
bei Glioblastomen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Karl Paul Willi Fengler
geboren am 21.07.1983 in Berlin

Betreuerin: Fr. PD Dr. med. A.Söling

Gutachter:

1. PD Dr. med. Ariane Söling, Universität Göttingen
2. Prof. Dr. rer. nat. Helge Taubert, Universität Halle (Saale)
3. Prof. Dr. rer. nat. Hanns Achim Temme, Technische Universität Dresden

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 02.06.2010

Datum der Verteidigung: 27.01.2011

Das *Glioblastoma Multiforme* gehört zu den prognostisch schlechtesten malignen Hirntumoren beim Menschen überhaupt. Vor dem Hintergrund einer auch unter intensiver multimodaler Therapie meist infausten Prognose erscheint die Weiterentwicklung bestehender Therapieverfahren und die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, z.B. in Form einer Suppression von Zellzyklus-assoziierten Genen, vordringlich. Ein potentes Ziel für eine solche Suppression stellt bei Glioblastomen das an der DNA-Replikation beteiligte *minichromosome maintenance* Protein 3 (MCM3) dar.

Zielstellung: Das Ziel dieser Arbeit war, in vitro das therapeutische Potenzial einer Suppression von *minichromosome maintenance* Protein 3 in humanen Glioblastomzellen zu prüfen, dazu wurden Einflüsse einer MCM3-Suppression auf Zellmorphologie, Zellproliferation und Zelltod untersucht.

Methoden: Mithilfe von *short-interfering-RNAs* wurde durch RNA-Interferenz MCM3 in humanen U87MG und U251 Glioblastomzellen supprimiert. Die Auswertung erfolgte durch Zellmikroskopie, Immunoblot-Verfahren und Methylnitrotetrazolium-Test.

Ergebnisse: Durch RNA-Interferenz wurde im Immunoblot eine MCM3-Suppression von über 90% des Ausgangswertes erreicht. Lichtmikroskopisch ließen sich morphologische Veränderungen der MCM3-supprimierten Zellen nachweisen. Im MTT-Test konnte für diese Zellen eine verringerte Wachstumsgeschwindigkeit nachgewiesen werden.

Schlussfolgerungen: Es konnte gezeigt werden, dass eine Suppression von MCM3 in humanen Glioblastomzellen eine Verringerte Proliferationsgeschwindigkeit und eine Veränderung des lichtmikroskopischen Erscheinungsbildes der Zellen zur Folge hat.

Fengler, Karl: Molekulare Antagonisierung von *minichromosome maintenance* Protein 3 bei Glioblastomen

Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 48 Seiten, 2010

Inhalt

	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	III
1	Einleitung	1
1.1	Gliome und Glioblastome	1
1.2	<i>Minichromosome maintenance</i> Proteine (MCM)	2
1.3	<i>Minichromosome maintenance</i> Protein 3 (MCM3)	3
1.4.1	RNA-Interferenz	5
1.4.2	<i>Off-target</i> -Effekte	8
1.4.3	<i>Plasmid-rescue</i>	9
1.5	Transfektion	9
1.6	Zielstellung	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Verwendete Materialien	11
2.2	Methoden	15
2.2.1	Zellkultur	16
2.2.2	Transfektion	16
2.2.3	Zellmikroskopie	18
2.2.4	Herstellung von Zelllysaten	18
2.2.5	LOWRY-Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung	18
2.2.6	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	18
2.2.7	<i>Semidry</i> -Immunoblot	19
2.2.8	Methyltetrazolium- (MTT-) Test	22
2.2.9	Statistik	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Effizienz der siRNA-Transfektion von humanen U87MG-Glioblastomzellen mit verschiedenen Liposomentypen	24
3.2	Beobachtungen bei der Zellmikroskopie	26
3.2.1	Humane U87MG-Glioblastomzellen	26
3.2.2	Humane U251-Glioblastomzellen	33
3.3	Immunoblot	34
3.3.1	MCM3-Suppression bei humanen U87MG-Glioblastomzellen	35
3.3.2	MCM3-Suppression bei humanen U251-Glioblastomzellen	40
3.4	MTT-Test bei mit den MCM3-siRNAs "13" und "3'UT" transfizierten humanen U87MG-Glioblastomzellen	40

4	Diskussion	41
4.1	Unterscheidung zwischen MCM3-spezifischen Effekten und <i>off-target</i> -Effekten	41
4.2	Morphologie, Proliferation und Zelltod bei mit den MCM3-siRNAs "13" und "3'UT" transfizierten humanen U87MG-Zellen	44
4.3	Schlussfolgerungen und Zusammenfassung	45
	Literaturverzeichnis	46
	Thesen	49

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

3'UT	3'-untranslatiert
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATM	<i>ataxia-teleangiectasia-mutated-proteinkinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serum-Albumin
bp	Basenpaar
bla	beta-Lactamase
cDNA	komplementäre DNA
Cdc	<i>cell division cycle</i>
Cdt1	<i>cell division cycle 10 dependent transcript 1</i>
DAPK	<i>death-associated-proteinkinase</i> (Zelltod assoziierte Proteinkinase)
DMEM	<i>Dulbecco's eagle medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dsRNA	Doppelstrang-RNA
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoreszinisothiocyant
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Merrettichperoxidase)
IgG	Immunglobulin G
MCM	<i>minichromosome maintenance</i> Protein
MCM3AP	<i>minichromosome maintenance</i> Protein 3 assoziierte Proteine
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTT	Methyltetrazolium
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
neo	Neomycin-Nukleotidyl-Transferase
NP-40	Nonidet P-40
ORC	<i>origin recognition complex</i>
pab	<i>polyclonal antibody</i> (Polyklonaler Antikörper)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PA-Gel	Polyacrylamid-Gel
pCMV	Zytomegalieviruspromotor

PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA-Interferenz
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfat</i> (Natriumdodecylsulfat)
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
TBS	tris-gepufferte Saline
TBS-T	tris-gepufferte Saline mit Zusatz von Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

1. Einleitung

1.1 Gliome und Glioblastome

Als Gliome werden Tumore bezeichnet, die sich vom Stützgewebe des Gehirnes ableiten. Hierbei wird zwischen verschiedenen Untergruppen unterschieden, wobei die Astrozytome zu den häufigsten und, abhängig vom Grad der Differenzierung, prognostisch schlechtesten gehören. Ausgangspunkt der Tumorentstehung sind hier sehr wahrscheinlich Astrozyten, es werden aber auch residuale neuronale Stammzellen als Ursprungsgewebe diskutiert [1]. Nach der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 1993 werden Astrozytome nach ihrer Malignität in vier verschiedene Grade eingeteilt. Grad I und II werden als niedriggradige, Grad III und IV als höhergradige Astrozytome bezeichnet. Im einzelnen unterscheidet man hier das pilozytische Astrozytom und das subependymale Riesenzellastrozytom (Grad I) sowie das fibrilläre oder gemistozystische Astrozytom (Grad II). Weiterhin unterscheidet man das anaplastische Astrozytom (Grad III) und als am stärksten dedifferenzierten Tumor das *Glioblastoma multiforme* (GBM, Grad IV). Dabei stellt Letzteres in Europa den größten Anteil aller malignen Hirntumore, mit einer jährlichen Inzidenz von 3,55 Fällen /100.000 Einwohner [2]. Fünfundneunzig Prozent der Glioblastome sind primäre (*de novo*) Tumore, fünf Prozent sekundär aus Astrozytomen niedrigeren Grades durch Progression entstandene Tumore [2]. Als einer der wenigen bisher identifizierten Risikofaktoren für die Entstehung dieses Tumors sind hohe Dosen ionisierender Strahlung bekannt.

Das *Glioblastoma multiforme* ist ein heterogener Tumor mit einem histologisch sehr variablen Zellbild, so werden multinukleäre Riesenzellen ebenso beschrieben wie kleinzellige Zelltypen.

Glioblastome sind in der Regel supratentoriell gelegen und breiten sich meist ohne klare Begrenzung entlang des Marklagers im Gehirn aus. Dies macht eine vollständige operative Entfernung des Tumors praktisch unmöglich.

Durch das aggressive und diffuse Wachstum liegt die mediane Überlebenszeit von Glioblastompatienten bei nur ca. 5 Monaten mit einer 2-Jahres-Überlebensrate von 3,3% [2]. Auch unter intensiver multimodaler Therapie, derzeit bestehend aus einer Kombination von operativer Tumorresektion, Radio- und Chemotherapie, kann diese mediane Überlebenszeit nur auf 11 bis 13 Monate verlängert werden [3].

Es konnte gezeigt werden, dass eine aggressive operative Resektion des Tumors v.a. bei jüngeren Patienten mit der medianen Überlebenszeit korreliert, wobei das primäre Ziel der Operation meist die Reduktion der Raumforderung und Gewinnung von Tumormaterial für eine histologische Untersuchung ist.

Eine alleinige kontakt- und stereotaktische Bestrahlung führt zu einer Verlängerung der Überlebenszeit um einige Monate [3].

In der Chemotherapie führt der Einsatz von Temozolomid und alternativ Nitrosoharnstoffen zur Verbesserung der Überlebenszeit der Patienten, der Erfolg dieser Behandlung ist dennoch als verhältnismäßig gering einzustufen. Glukokortikoide werden adjuvant zur Behandlung des begleitenden Hirnödems eingesetzt, Untersuchungen zur Effektivität des *vascular endothelial growth factor (VEGF)*-Rezeptor-Antagonisten Bevacizumab in der Glioblastomtherapie sind derzeit noch nicht vollständig abgeschlossen [3,4]

Auch unter multimodaler, radikaler operativer, Radio- und Chemotherapie ist die Prognose des Glioblastoms meist infaust. Daher erscheint die Weiterentwicklung bestehender Therapieverfahren und die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, z.B. in Form einer Suppression von Zellzyklus-assoziierten Genen, vordringlich. Ein potentielles Ziel für eine solche Suppression stellen bei Glioblastomen die an der DNA-Replikation beteiligten *minichromosome maintenance* Proteine (MCM) dar.

1.2 Minichromosome Maintenance Proteine (MCM)

Während der Zellteilung eukaryotischer Zellen wird die DNA im Zellkern repliziert. Hierzu muss die in zwei Strängen ineinander gewundene DNA zunächst an den Orten der Replikation (sog. Replikationsgabel) lokal entwunden werden, daran beteiligt ist der sogenannte Präreplikationskomplex, zu dem auch die MCM-Proteine gehören.

Dabei formieren sich die *minichromosome maintenance* Proteine 2-7 in der G₁-Phase des Zellzyklus zusammen mit dem *origin recognition complex* (ORC), den *cell division cycle 6 / 18* (Cdc6 / Cdc18) Proteinen sowie dem *cell division cycle 10 dependent transcript 1* (Cdt1) Protein zum Präreplikationskomplex, der an die DNA bindet. Die Helikase-Aktivität dieses Komplexes führt zur Abwicklung der DNA, so dass die für die DNA-Elongation nötigen Komponenten (z.B. DNA-Polymerasen) an die dadurch entstehende Replikationsgabel binden können. Die anschließende Dissoziation des Komplexes von der DNA in der S- und G₂-Phase des Zellzyklus stellt sicher, dass die DNA nur einmal pro Zellzyklus repliziert wird [5].

Die MCM-Proteine unterteilen sich in 10 verschiedene Subtypen (MCM1-10), die zueinander stark homolog sind und alle eine konservierte Nukleotid-bindende Domäne aufweisen. MCM-Proteine sind in sich teilenden, nicht jedoch in ausdifferenzierten bzw. seneszenten Zellen zu finden. Aus diesem Grund sind einzelne MCM-Proteine als Marker für Proliferation verwendbar (MCM2, MCM5, MCM6, MCM7) [6,7,8,9] sowie als Indikator für Dysplasie und Malignität (MCM2-7) [10]. Auch sind einige als

Prognosefaktoren bei diversen Krebserkrankungen (MCM2 bei Brustkrebs, *diffuse large B-Zell-Lymphom*, Harnblasenkarzinom) [6,8,11], MCM6 bei Mantelzell-Lymphom [12] und MCM 7 bei Endometrium-Karzinom [7]) identifiziert worden. MCM5 ist bei Harnblasenkarzinom auch diagnostisch verwendbar [13].

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte die Expression von MCM3 bei humanen Astrozytomen auf ihre prognostische Aussagekraft [14].

1.3 Minichromosome Maintenance Protein 3 (MCM3)

Minichromosome maintenance Protein 3 hat ein Molekulargewicht von 105 kDa, besteht aus 808 Aminosäuren und hat in humanen HeLa-Zellen (humane Zervixkarzinom-Epithelzellen) eine Halbwertszeit von ca. 24h [15]. Das korrespondierende Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (6p12, Locus NM_002388).

MCM3 greift über mehrere Signalwege in wichtige zelluläre Regulationsmechanismen ein: MCM3 ist ein Teil des Präreplikationskomplexes (s.o.), außerdem konnten über β -Tubulin Einflüsse auf die Zytokinese während der Mitose [16] und über MCM3-assoziierte Proteine (MCM3AP) Wirkungen auf den Glukokortikoidrezeptor gefunden werden [17,18]. Für ein während der Apoptose entstehendes Fragment von MCM3 wurde ein proapoptotischer Effekt nachgewiesen [19].

Die Regulation der Proteinaktivität selbst wird durch Phosphorylierung im carboxy-terminalen Bereich des Proteins gesteuert. Vermutlich spielt hier die *ataxia-teleangiectasia-mutated-proteinkinase* (ATM), ein für die Reparatur von DNA-Schäden regulierendes Enzym, das durch DNA-Schäden induziert auch über den p53-Signalweg wirkt, für diese Phosphorylierung eine entscheidende Rolle [20,21]. P53 ist ein zentraler eukaryotischer Tumorsuppressor.

MCM3 ist außerdem ein Substrat der für den programmierten Zelltod wichtigen *death-associated-proteinkinase* (zelltod-assoziierte Proteinkinase, DAPK) [22].

Durch unsere Arbeitsgruppe konnte erstmals gezeigt werden, dass MCM3 in humanen Astrozytomen im Vergleich zu normalem Hirngewebe verstärkt exprimiert wird (Abb. 1.1) und für Astrozytom-Patienten einen Prognosefaktor darstellt [14].

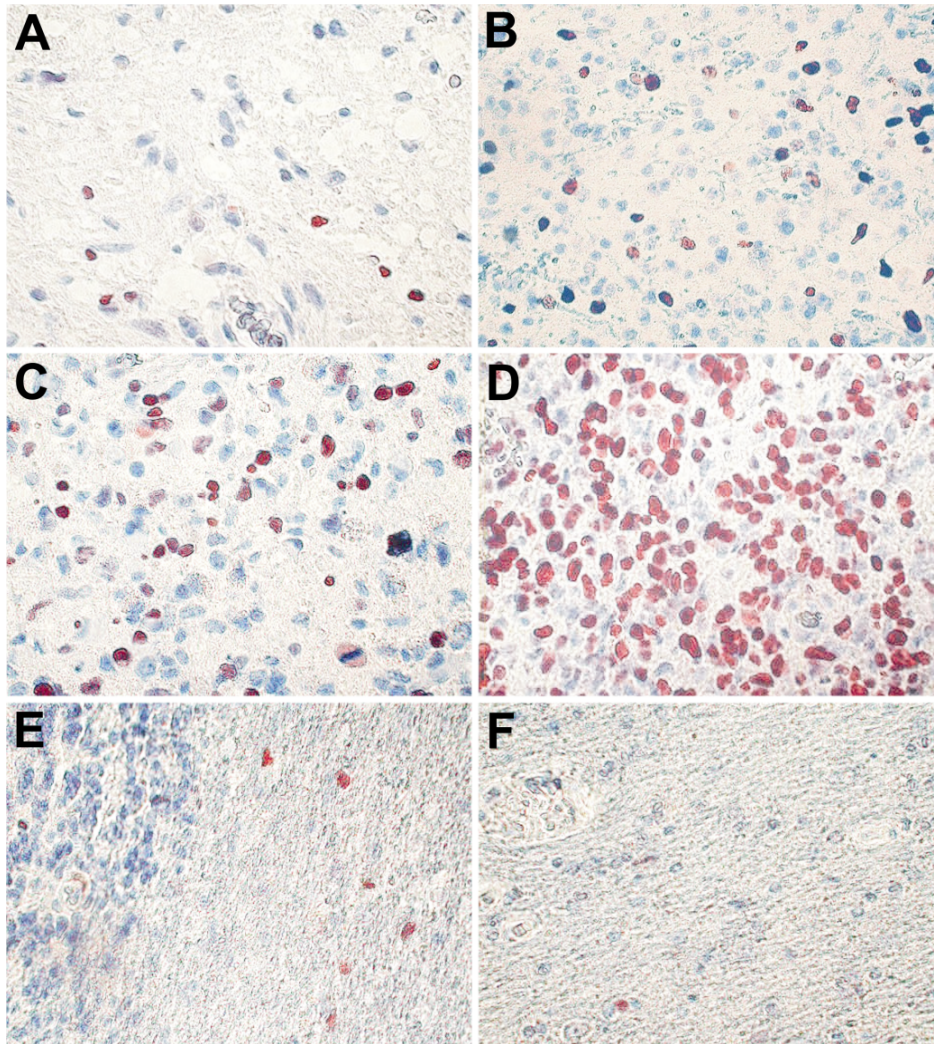


Abb. 1.1: Immunohistochemische Detektion der MCM3-Expression in Astrozytomen und normalem Hirngewebe (x 400). A, Astrozytom WHO Grad I; B, Astrozytom WHO Grad II; C, anaplastisches Astrozytom; D, Glioblastoma multiforme; E, normales Kleinhirngewebe (*cerebellum*); F, normales Großhirngewebe (*cerebrum*) [14]. Die intensive Braunfärbung zeigt die hohe MCM3-Expression beim Glioblastoma Multiforme.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass das Niveau der MCM3-Proteinexpression (*Labeling Index*, Prozentsatz MCM3-positiver Zellen) einen prognostischen Wert für Patienten mit anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III) besitzt, nicht jedoch für Patienten mit Glioblastomen (WHO Grad IV) [14].

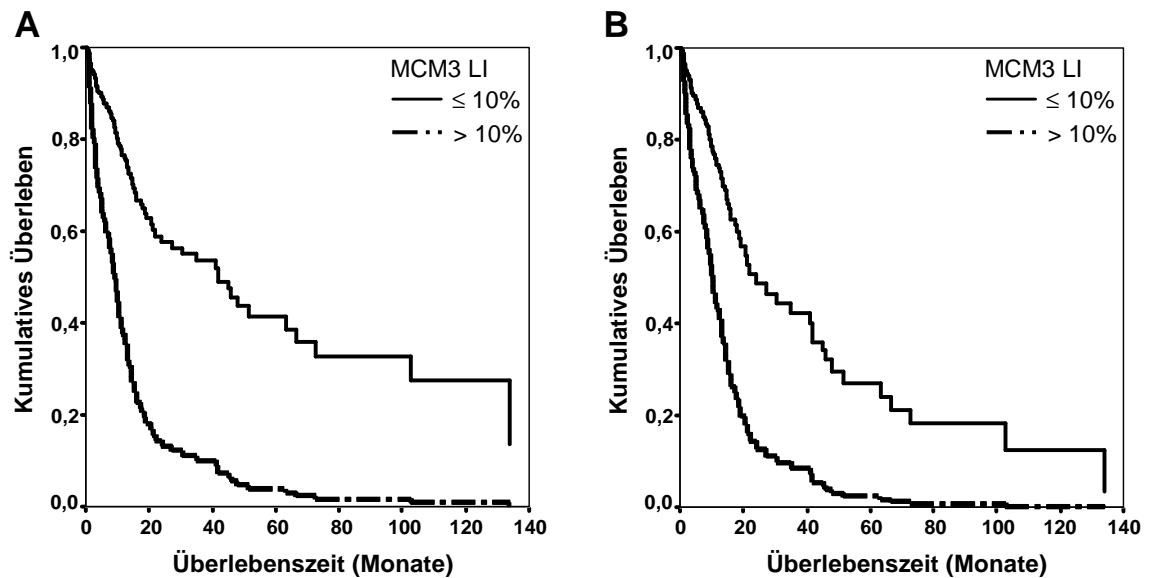


Abb. 1.2: Univariate (A; $p=0,006$) und multivariate (B; $p=0,014$) Cox Regressionsanalyse. Untersucht wurde das Überleben von Patienten mit Astrozytomen der WHO Grade II-IV in Bezug auf die intratumorale MCM3-Expression. Bei der multivariaten Analyse wurden das Geschlecht, das Alter, sowie der histologische Differenzierungsgrad miteinbezogen. LI = *labeling index* [14].

Hier stand für unsere Arbeitsgruppe die Tatsache im Vordergrund, dass eine Überexpression von MCM3 in anaplastischen Astrozytomen mit einer verringerten mittleren Überlebenszeit der Patienten einhergeht. Auf Basis der erhobenen Befunde stellte sich für uns die Frage welche Effekte eine Suppression des in Glioblastomzellen ebenfalls überexprimierten MCM3 haben könnte, bzw. ob diese Suppression zu einem Proliferationsstopp oder vielleicht sogar zur Apoptose führen könnte und sich so therapeutisch nutzen ließe. Um diese Fragestellung näher zu untersuchen, wurde als eine derzeit weit verbreitete Technik zur Proteinsuppression die RNA-Interferenz für die Durchführung unserer Versuche verwendet.

1.4.1 RNA-Interferenz

Bei der RNA-Interferenz (RNAi) handelt es sich um einen bei eukaryotischen Zellen evolutionär konservierten Mechanismus zur Proteinsuppression, vermutlich bestand seine ursprüngliche Funktion in einem Schutz der Zelle vor der Expression fremder Gene, z.B. solche viralen Ursprungs. A. Fire und C. Mello beschrieben dieses Prinzip zunächst für den Fadenwurm *C. elegans* [23], mittlerweile ist es bei zahlreichen Eukaryoten beschrieben, so auch bei humanen Zellen. Der Mechanismus beruht auf einer Spaltung der *messenger-RNA* (mRNA) durch zelleigene Proteine und hemmt somit indirekt die Proteinbiosynthese.

Es existieren verschiedene Wege der RNA-Interferenz, der derzeit am besten untersuchte ist der über sogenannte *short interfering RNAs* (siRNAs), kurze doppelsträngige RNA-Moleküle.

Dabei werden in der Zelle ca. 50-60 Basenpaare (bp) lange doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) synthetisiert und von der zelleigenen RNase *Dicer* unter ATP-Verbrauch zu kurzen doppelsträngigen RNA-Fragmenten (19-21 bp, siRNAs) prozessiert. Bei diesen Fragmenten ist einer der Einzelstränge komplementär zur Sequenz der entsprechenden Ziel-mRNA (*sense*-Strang). Die siRNAs formieren sich mit verschiedenen Proteinen zum *RNA-induced-silencing-complex* (RISC), welcher ATP-abhängig unter Entwindung des Doppelstranges und Integration eines siRNA-Einzelstranges in den Komplex aktiviert wird. Der verbleibende mRNA-homologe Einzelstrang (sog. *passenger*-Strang) wird durch Spaltung inaktiviert. In seiner jetzt aktiven Form verfügt der Komplex über RNase-Aktivität. Der RISC bindet an eine zum integrierten RNA-Strang komplementäre Region und spaltet diese, was eine Translation der mRNA verhindert und somit indirekt zu einer Herabregulation der Synthese des entsprechenden Proteins führt. Der aktive RISC bleibt hierbei erhalten und kann weitere mRNA-Stränge spalten (vgl. Abb. 1.3).

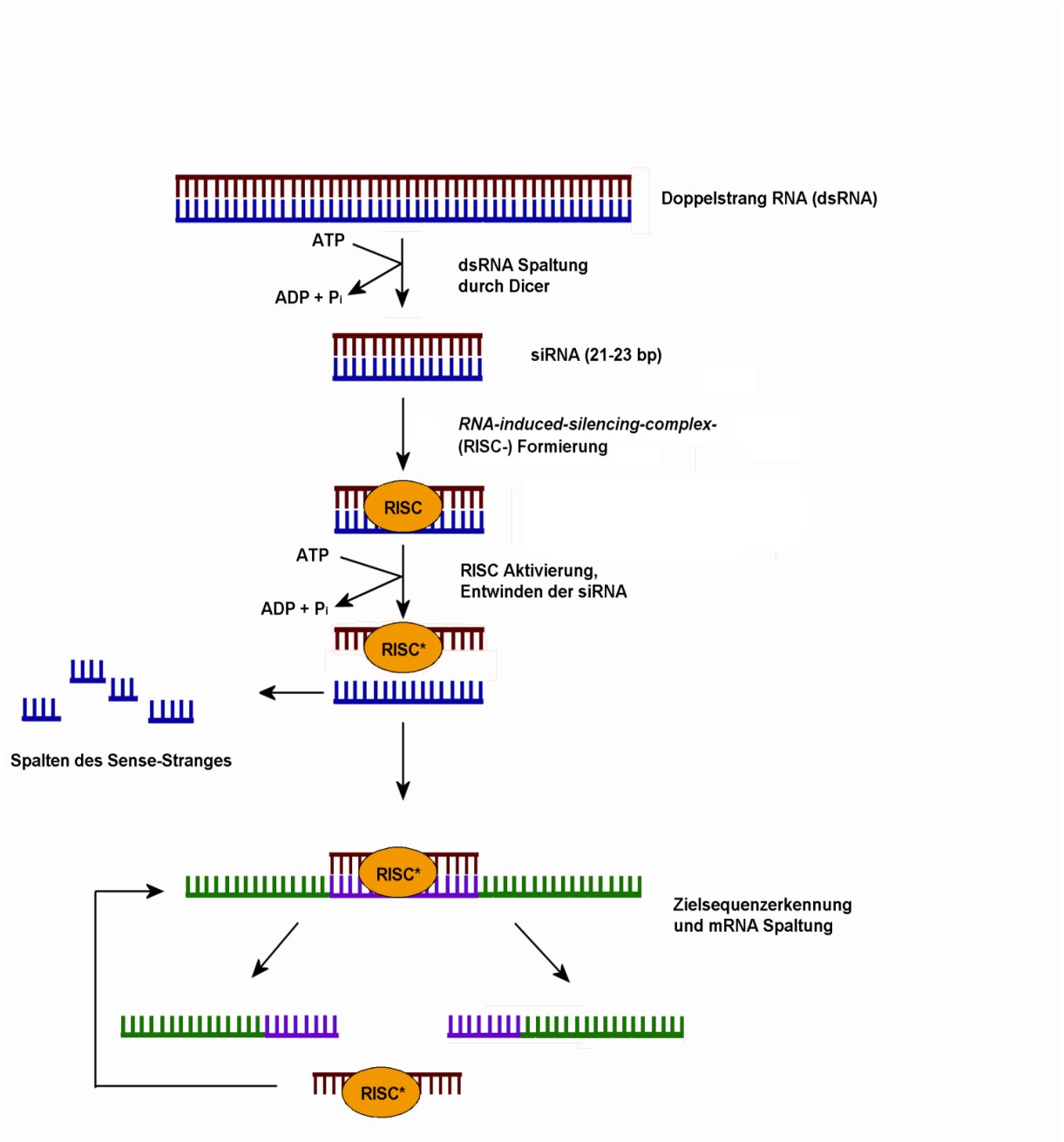


Abb. 1.3: Mechanismus der RNA-Interferenz durch *short-interfering-RNAs* (siRNAs).

Dieser Mechanismus kann zur gezielten Suppression einer mRNA und des dazugehörigen Proteins genutzt werden. Dabei werden zur Zielsequenz homologe doppelsträngige siRNAs in die Zielzelle eingebracht, wo sie durch direkte Integration in den RISC ohne vorherige Prozessierung durch *Dicer* eine mRNA-Suppression auslösen können.

Für siRNA-Versuche werden heutzutage meist industriell synthetisierte Nukleotidsequenzen verwendet. Hierbei werden nach bestimmten Algorithmen Sequenzen gesucht, die das Zielgen mit möglichst großer Effizienz supprimieren.

Um einen Kontrollwert des untersuchten Proteins zu bestimmen, werden sog. Negativ-Kontrollen verwendet, dabei handelt es sich um siRNAs, die nachweislich keinerlei spezifische Bindung an mRNAs der untersuchten Zelle aufweisen dürfen.

Weiterhin ist es wichtig die Spezifität der verwendeten siRNA-Sequenz für das gewünschte Ziel zu prüfen. Geschieht dies nicht, kann es in der Zielzelle zu einer unspezifischen Proteinsuppression kommen, den sog. *off-target*-Effekten.

1.4.2 Off-Target-Effekte

Das Entstehen von *off-target*-Effekten ist eines der Hauptprobleme bei der experimentellen Nutzung von RNA-Interferenz. Hierbei kommt es konzentrationsabhängig zu unspezifischen siRNA-Wirkungen auf andere mRNAs als die Zielsequenz, wofür es verschiedene Ursachen geben kann. So kann es vorkommen, dass der *passenger*-Strang und somit eine andere Nukleotidsequenz als erwünscht in RISC integriert wird. Auch wurde gezeigt, dass eine gewisse Zahl an nicht homologen Basenpaarungen oder sog. *Wobble*-Paarungen zwischen mRNA und siRNA die Spezifität der Proteinsuppression nicht negativ beeinflusst [24,25]. Vielmehr ist es sogar so, dass z.T. eine Übereinstimmung in nur 6-7 Basenpaarungen in einem zentralen Abschnitt der siRNA für eine unerwünschte Bindung ausreicht [26].

Durch bei der siRNA-Synthese erfolgte chemische Modifikationen (z.B. die hier bei einigen Versuchen verwendete *On-Target*TM-Modifikation der Firma Dharmacon) kann das Einschleusen des *passenger*-siRNA-Stranges verhindert werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit durch Verwendung mehrerer verschiedener siRNAs, die gegen die gleiche mRNA gerichtet sind, *off-target*-Effekte leichter von unspezifischen Effekten zu unterscheiden, dennoch ist bei der Verwendung von siRNAs in höheren Konzentrationen mit dem Auftreten von *off-target*-Effekten zu rechnen [25,30].

Eine weitere mögliche, wenn auch seltenere Fehlerquelle bei siRNA-Versuchen ist die mögliche Interaktion der siRNAs mit *toll-like*-Rezeptoren und daraus resultierender Freisetzung von Interferonen durch die Zielzelle, was in der Regel zu Transkriptions- und Translationshemmung und unspezifischem Zelltod führt [25,27,28]. Bei mangelnder Verwendung von Kontrollen kann dieser Effekt (Zelltod) leicht als ein erwünschter spezifischer Effekt interpretiert werden. Speziell für nicht modifizierte siRNAs wird dieses Problem beschrieben und kann leicht zu Missinterpretation von siRNA-Versuchen führen [28].

1.4.3 *Plasmid-Rescue*

Ein Weg mit größtmöglicher Sicherheit festzustellen, ob ein *off-target*-Effekt vorliegt, ist der sog. *plasmid-rescue*. Dabei wird zusätzlich zur siRNA noch das Zielgen, in unserem Falle MCM3, in Form von komplementärer DNA (cDNA) in die Zelle eingebracht und überexprimiert. Die cDNA-Sequenz wird hierbei so manipuliert, dass zwar das korrekte Genprodukt in der Zielzelle synthetisiert wird, die gleichzeitig in die Zelle eingebrachte, in diesem Fall für MCM3 spezifische, siRNA jedoch nicht an die zur cDNA korrespondierende mRNA binden kann. Durch die Überexpression des Genprodukts (MCM3) sollte es im Idealfall möglich sein, die durch die siRNA ausgelösten spezifischen Effekte aufzuheben.

Für die Wahl der cDNA gibt es verschiedene Möglichkeiten: Entweder wird das betroffene Gen in der Zielregion durch Punktmutation abgeändert, so dass die siRNA nicht mehr spezifisch binden kann, was bei inzwischen erwiesener Wirksamkeit dieser sog. *missmatch*-siRNAs problematisch ist [24,25]. Alternativ kann auch eine manipulierte cDNA ohne den 3'-untranslatierten Bereich des Gens gewählt werden, und gleichzeitig eine gegen den 3'-untranslatierten Bereich der endogenen mRNA gerichtete siRNA in die Zelle eingebracht werden.

Sollte nun der siRNA-induzierte Effekt nicht auftreten, so ist von der Spezifität des beobachteten Effektes auszugehen [29,30]. Umgekehrt kann bei einem erneuten Auftreten des Effekts unter dem Einfluss des Plasmids dennoch nicht direkt auf einen *off-target*-Effekt geschlossen werden, da durch die verwendete siRNA auch irreversible Veränderungen ausgelöst werden können. Außerdem ist unter anderem auch die Wahl des richtigen Zeitpunktes für den Transfer der siRNAs und Plasmide in die Zellen entscheidend.

Für die hier durchgeführten *plasmid-rescue*-Experimente nutzten wir spezifische, an die 3'-untranslatierte (3'UT) Region der mRNA bindende MCM3-siRNAs (MCM3-siRNA "3'UT").

Eine weitere Herausforderung bei der experimentellen Nutzung von siRNA besteht im Transfer der siRNA-Sequenzen in die Zielzelle, der sogenannten Transfektion.

1.5 Transfektion

Nukleinsäuren können eukaryotische Zellmembranen aufgrund ihrer Polarität nur schwer durchdringen, daher ist es für einen effektiven Transfer in die Zielzelle sinnvoll, sie an Trägersubstanzen zu koppeln. Hierfür gibt es verschiedene Methoden. Bei Zellkultur-Versuchen werden als Vektor in der Regel Liposomen aus kationischen Lipiden verwendet, die direkt in die Zelle aufgenommen werden und im Zellinneren ihre Ladung freigeben. Die *in-vivo*-Anwendung von siRNAs ist aufgrund der erforderlichen

höheren Zielgewebe- / Zielzellspezifität und der direkten Toxizität der hierfür erforderlichen hohen Liposomen-Dosen wesentlich komplizierter. Sie wird daher gegenwärtig bis auf wenige klinische Studien hauptsächlich tierexperimentell genutzt. Zukünftig können für *in vivo* Experimente unter Anderem die Kopplung an für das Zielgewebe spezifische Antikörper, Cholesterinverbindungen oder der Transfer über virale Vektoren eine Option darstellen [31,32,33,34]. Bei den hier durchgeführten Versuchen erfolgte die Transfektion mit Hilfe spezieller für den Transfer kurzkettiger Nukleinsäuren optimierter Liposomen.

1.6 Zielstellung

Das Ziel meiner Arbeit war, *in vitro* das therapeutische Potenzial einer Suppression von *minichromosome maintenance* Protein 3 in humanen Glioblastomzellen zu prüfen.

Hierzu wurde untersucht, ob:

- 1) die MCM3-Suppression mit Hilfe von RNA-Interferenz effektiv und spezifisch möglich ist.
- 2) die MCM3-Suppression Einfluss auf Zellmorphologie, Zellproliferation und Zelltod hat.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

Puffer/Lösungen

1% Blotto:

1% Magermilchpulver
0,01% Thimerosal
in tris-gepufferten Saline (TBS)

2% Blotto:

2% Magermilchpulver
0,02% Thimerosal
in TBS

Ponceau S Färbelösung:

0,5% Ponceau S
1% Eisessig

RIPA-Lysepuffer:

150 nM NaCl
1 % Nonidet P-40 (NP-40)
0,5 % Na Desoxycholat
0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)
50 nM Tris / HCl pH 8
1 mM Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA) pH 8
5% 20x Proteaseinhibitor

8x Sammelgelpuffer:

500 nM Tris/HCl pH 6,8
0,8 % SDS

SDS-Laufpuffer:

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % SDS

TBS (tris-gepufferte Saline):

20 mM Tris pH 8

10mM NaCl

TBS-T (tris-gepufferte Saline mit Tween-Zusatz):

TBS mit 0,05% Tween 20

TOWBIN-Transferpuffer:

25 mM Tris

192 mM Glycin

0,1 % SDS

20 % Methanol

4x Trenngelpuffer:

1,5 M Tris/HCl pH 8,8

0,8 % SDS

Antikörper und Hersteller

Monoklonaler α -Tubulin-IgG-Antikörper Dianova GmbH, Hamburg

MCM3-Antiserum Prof. em. Knippers, Konstanz

Polyklonaler Kaninchen-IgG-Antikörper BD Biosciences Europe, Erembodegem, Belgien

Polyklonaler Maus-IgG-Antikörper Jackson ImmunoResearch Europe Inc., Suffolk, GB

Chemikalien/Gebrauchslösungen und Hersteller

Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bio-Rad DC Proteinassay	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
<i>Dulbecco's Eagle Medium</i> (DMEM)	Biochrom AG, Berlin
EDTA	Reatec GmbH, Weiterstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Entwickler/Fixierer Professional	Eastman Kodak Co., Rockford, USA
FCS	Biochrom AG, Berlin
Glycin	AppliChem, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
Film (Hyperfilm™ ECL)	Amersham Biosciences UK Ltd., Buckinghamshire, UK
Isopropanol	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Magermilchpulver	TSI GmbH & Co. KG, Zeven
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl	VWR international, Fontenais sous Pois, Frankreich
Na Desoxycholat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NP-40	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
OptiMEM	Invitrogen, Paisley, GB
Phosphat-gepufferte Saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin
Ponceau S	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Complete® Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
RotiMark® Prestained	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SuperSignal® West Pico Solutioin	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Thimerosal	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris	AppliChem, Darmstadt
Typanblau	Sigma-Aldrich Co. Ltd., Irvine, GB
Trypsin / EDTA-Lösung (10x)	Biochrom AG, Berlin
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Tween 20	Reatec GmbH, Weiterstadt

siRNA/Plasmid-Sequenzen und Hersteller

Siehe Tabelle und Abb. 2.1

Tabelle 2.1: verwendete siRNAs			
Produkt	Hersteller	Kurzform	Sequenz
<i>ON-TARGET plus siCONTROL Non-Targeting siRNA</i>	Dharmacon Inc., Chicago, USA	K3	5'-UGGUUACAUGUCGACUAA-3'
<i>siGENOME ON-TARGET plus (10)</i>		10	5'-UAACAUUACAGGCAAUCAGUU-3'
<i>siGENOME ON-TARGET plus (13)</i>		13	5'-UUGUUCAGAAGCCGGUUAGUU-3'
Negativ-kontrolle (HPLC-gereinigt / entsalzt)	MWG Biotech AG, Ebersberg	K1	5'-AGGUAGUGUAAUCGCCUUGTT-3'
<i>Control-Dharma2</i> (HPLC-gereinigt)		K2	5'-UGGUUUACAUGUCGACUAATT-3'
MCM3 siRNA 1 (HPLC-gereinigt / entsalzt)		1	5'-GAAGCGAAGUGAGGAUGAATT-3'
MCM3 siRNA 2 (HPLC-gereinigt / entsalzt)		2	5'-GACCAUAGAGCGACGUUAUTT-3'
MCM3 siRNA 3'UT (HPLC- gereinigt)		3'UT	5'-CAGUUAAGGUGAAUAUGUATT-3'

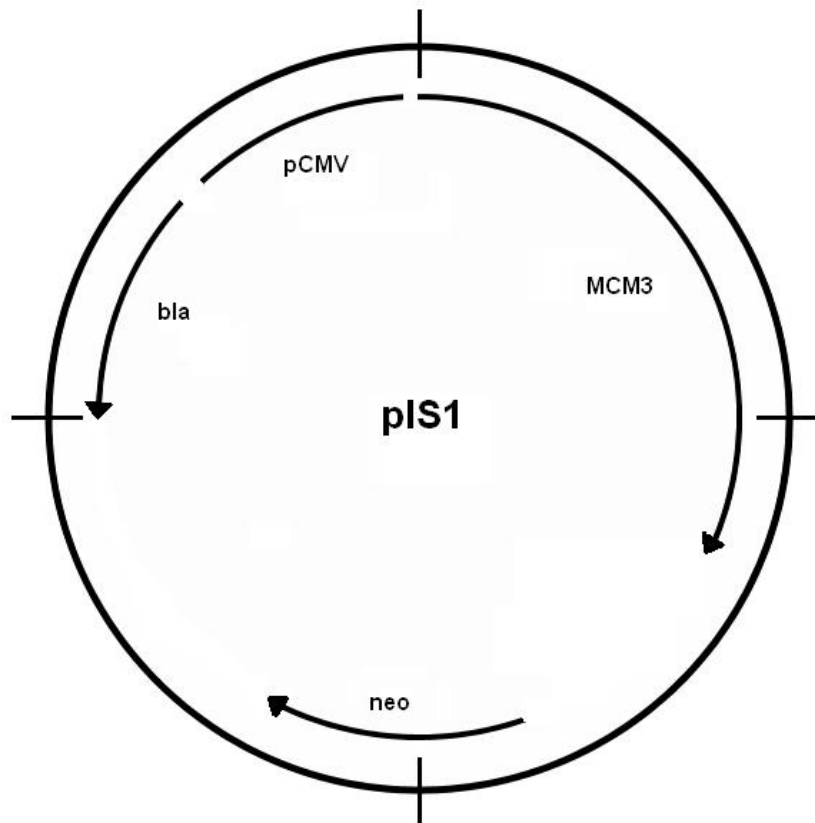


Abb. 2.1: MCM3-Plasmid "pIS1" zur transienten Transfektion von MCM3, schematische Darstellung: MCM3 = *minichromosome maintenance* Protein 3, neo = Neomycin-Nukleotidyl-Transferase, bla = beta-Lactamase, pCMV = Zytomegalieviruspromotor.

2.2 Methoden

Um den Einfluss von MCM3 auf humane Glioblastomzellen zu untersuchen, wurde das Protein durch RNA-Interferenz supprimiert. Hierfür wurde die Oligonukleotid-Transfektion mit Hilfe von Liposomen an zwei humanen Glioblastom-Zelllinien durchgeführt. Außerdem wurde die Methode mit Hilfe eines *plasmid-rescues* überprüft. Die Untersuchung des Effektes wurde vorwiegend im Immunoblotverfahren durchgeführt, um das Ausmaß der MCM3-Suppression auf Proteinebene zu erfassen. Weiterhin erfolgte eine Zellproliferationsmessung mittels MTT-Test sowie eine mikroskopische Beobachtung und Beurteilung der Zellen. Alle Versuche wurden mindestens zweifach wiederholt.

2.2.1 Zellkultur

Die Zellkulturexperimente wurden auf einer sterilen Werkbank mit Laminarfluss durchgeführt. Es wurden humane Glioblastomzellen der Typen U87MG (Wildtyp p53) und U251 (mutiertes p53) verwendet. Zum Plattieren der Zellen wurden diese nach Absaugen des Mediums 2x mit phosphat-gepufferter Saline (PBS) gewaschen und anschließend kurz mit Trypsin behandelt, um die Zellen von der Kulturschale zu lösen. Anschließend wurden die Zellen in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) +10% fötalem Kälberserum (FCS) suspendiert und vereinzelt. Nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden entsprechende Volumina der Zellsuspension mit DMEM +10% FCS auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt (Tabelle 2.2). Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Tabelle 2.2: Zellkulturbedingungen (Angaben pro Vertiefung)				
Kulturplatte	Fläche [cm ²]	Plattierte Zellzahl	Volumen Medium [ml]	Zelllinie
6-Loch	9,0	100-150 x 10 ³	2,0	U87MG
6-Loch	9,0	200 x 10 ³	2,0	U251
12-Loch	4,0	50 x 10 ³	1,0	U87MG
24-Loch	1,89	30 x 10 ³	0,5	U87MG
96-Loch	0,24	2 x 10 ³	0,1	U87MG

2.2.2 Transfektion

Die Effizienz der liposomalen Transfektion wurde mithilfe von UV-Fluoreszenzmikroskopie evaluiert. Für siRNA-Versuche wurden hierfür mit dem Farbstoff Fluoreszinisothiocyanat (FITC) markierte siRNAs verwendet, für die Plasmid-Transfektion wurden Plasmide verwendet, die das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) exprimierten.

Aufgrund der im Vergleich mit anderen Typen geringeren Eigentoxizität und hohen siRNA-Transfektionseffizienz der Liposomen vom Typ *Lipofectamine RNAiMAX*TM wurden diese für den Großteil der siRNA-Versuche verwendet. Für Plasmid-Versuche wurde aufgrund der besseren Effizienz der transienten Plasmid-Transfektion *Lipofectamine 2000*TM-Liposomen verwendet.

Für die Transfektion wurden die Zellen auf 6-Loch-Mikrotiterplatten kultiviert. Es wurden initial 1x10⁵ U87MG-Zellen / Vertiefung und 2x10⁵ U251-Zellen / Vertiefung in 1,6 ml DMEM +10% FCS plattiert und 22-26 h (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Dann wurden zunächst die Liposomen mit *OptiMEM* gemischt (200µl / Vertiefung) und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dabei wurden für die Transfektion von siRNAs 7,5 µl oder

5,0 µl *Lipofectamine RNAiMAX*TM / Vertiefung, für die transiente Plasmid-Transfektion auf Grund der höheren Toxizität 2,5 µl *Lipofectamine 2000*TM / Vertiefung verwendet. Die siRNA- und/oder Plasmide wurden getrennt jeweils mit einer entsprechenden Menge *OptiMEM* gemischt (200 µl / Vertiefung). Anschließend wurden die beiden Gemische vereinigt und nach 20-25 min die dann beladenen Liposomen zu den Zellen ins Medium gegeben.

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden in separat durchgeführten Versuchen FITC-markierte siRNAs für die siRNA-Transfektion sowie ein EGFP-Plasmid für die Plasmid-Transfektion verwendet und mikroskopisch ausgewertet.

Aufgrund während der Experimente aufgetretener *off-target*-Effekte wurden siRNAs von verschiedenen Herstellern verwendet, einige der Sequenzen wurden wegen *off-target*-Effekten für die weitere Diskussion der Versuche nicht weiter verwendet (s.u., 4.1).

Es wurden insgesamt drei verschiedene Negativ-Kontroll-Sequenzen verwendet, die äquimolar mit den zu untersuchenden MCM3-siRNAs eingesetzt wurden. Wurden MCM3-siRNAs verschiedener Molaritäten untersucht, wurde die Kontroll-siRNA mit der höchsten eingesetzten MCM3-siRNA-Konzentration transfiziert.

Laut Herstellerangaben waren für eine der Kontrollen (*Dharmacon OnTarget plus siCONTROL*, "K3") mit einem RNA-*microarray*-Test *off-target*-Effekte ausgeschlossen worden. Um herstellerbedingte Fehler besser erkennen zu können waren die Sequenzen der Kontroll-siRNAs "K2" und "K3" identisch.

Es wurden 5 MCM3-Antisense-siRNAs verwendet, zwei davon mit *Dharmacon OnTarget*TM-Modifikationen zur Reduktion des Risikos von *off-target*-Effekten [25]. Die siRNAs "K1", "1" und "2" lagen in unterschiedlichen Reinheitsgraden vor, sowohl einfach entsalzt als auch in einer *high performance liquid chromatography* (HPLC)-gereinigten Form mit höherem Reinheitsgrad (Abb. 2.1).

Um herstellerbedingte Fehler zu minimieren wurden immer Kontroll-siRNA und MCM3-siRNA gleicher Hersteller zusammen eingesetzt, d.h. für die MCM3-siRNAs "1", "2" und "3'UT" wurden die Kontroll-siRNAs "K1" oder "K2" verwendet, für die MCM3-siRNAs "10" und "13" die Kontroll-siRNA "K3".

Für die transiente Plasmid-Transfektion wurde ein Plasmid (8 kbp) mit einem dem MCM3-Gen vorgeschalteten permanent aktiven Zytomegalievirus-Promotor verwendet (Abb. 2.2). Für die *plasmid-rescue*-Versuche wurde eine siRNA verwendet, deren Zielsequenz im untranslatierten Bereich am 3' Ende des MCM3-Gens lag und in der MCM3-Plasmidsequenz nicht vorhanden war (MCM3-siRNA "3'UT").

2.2.3 Zellmikroskopie

Für die optische Beurteilung von Zellproliferation und Morphologie wurden die Zellen durch ein konventionelles Inversions-Lichtmikroskop mit Phasenkontrastfilter betrachtet. Für die FITC/EGFP-Beurteilung wurde zusätzlich die UV-Fluoreszenz-Mikroskopie verwendet. Die Ergebnisse wurden mit einer festinstallierten Kamera dokumentiert. Bei der Zellbeobachtung wurden vor allem Zelltod, Zellmorphologie sowie Wachstumsgeschwindigkeit durch Vergleich mit adäquaten Kontrollen beurteilt.

2.2.4 Herstellung von Zelllysaten

Für die Auswertung im Immunoblotverfahren wurden die jeweiligen Zellproben in einem an die Zellkonfluenz angepassten Volumen Radioimmunoprecipitationsassay-Puffer (RIPA-Puffer) auf Eis lysiert, mit einem Homogenisator zerkleinert, über einen Zeitraum von 20 min intermittierend auf einem Vortexer gemischt und anschließend 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.5 LOWRY-Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinbestimmungsmethode nach Lowry et al. beruht auf der Umsetzung von zwei- zu einwertigem Kupfer unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart von Proteinen, welches bei der Reaktion mit *Folin-Ciocalteu*-Reagenz zur Bildung von Molybdänblau führt. Durch Messung der Absorption bei 660nm lässt sich anhand einer aus mitgeführtem Proteinstandard erstellten Eichgeraden die Proteinkonzentration der untersuchten Probe bestimmen. Es wurden fertig konfektionierte Reagenzien der Firma Bio-Rad Laboratories verwendet (*Bio-Rad DC Assay*®). Als Proteinstandard wurde bovines Serum-Albumin (BSA) in RIPA-Lysepuffer verwendet.

Von den zu untersuchenden Proben wurden 5 μl auf einer 96-Loch-Mikrotiterplatte 1:10 verdünnt in Duplikaten, die BSA-Proteinstandards (0-1,2 mg / ml) in Triplikaten geladen. Dann wurden 25 μl einer Mischung aus Reagenz A und S (20 μl Reagenz S / ml Reagenz A) je Vertiefung zugegeben, 200 μl Reagenz B hinzugefügt und nach 15 min die Absorption bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit den Programmen WorkOut® und MS-Excel®.

2.2.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine unter Anlegen einer elektrischen Spannung nach ihrer Größe aufgetrennt. Dabei wirkt das Gel als Molekularsieb auf die durch Natriumdodekylsulfat (SDS) denaturierten Proteine, die

dadurch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch Mitführen eines Proteinmolekulargewichtsstandards kann die Größe der Proteine bestimmt werden. Es wurden in einer *Mighty Small*® Gussform (Firma Hoefer) ein in Bezug auf die Acrylamidkonzentration 7,5%iges Trenngel und ein 3,5%iges Sammelgel gegossen (s. Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Zusammensetzung eines Minigels		
	Trenngel	Sammelgel
H ₂ O	3,57 ml	1,46 ml
Acrylamid+Bisacrylamid 30%	1,875 ml	0,23 ml
4x Trenngelpuffer	1,9 ml	-
8x Sammelgelpuffer	-	0,25 ml
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	4,5 µl	3 µl
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	75 µl	20 µl

20 µg der zu analysierenden Proteinlysate wurden in 1x Lämmli-Puffer auf ein Volumen von 10-20 µl eingestellt. Anschließend wurde das Gemisch bei 95°C für 5 min denaturiert, auf Eis gelagert und mit einer Pipette auf das Gel geladen. Zusätzlich wurde ein Proteinmolekulargewichtsstandard geladen (*Roti*® - *Mark Prestained*). Die Proben wurden mit einer Stromstärke von max. 20 mA im Gel aufgetrennt, nach Ende des Laufs das Gel aus der Laufkammer entfernt und als Vorbereitung auf den folgenden Immunoblot 10 min in Transferpuffer äquilibriert.

2.2.7 *Semidry*-Immunoblot

Beim Immunoblot handelt es sich um eine Methode zum quantitativen Nachweis spezifischer Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper. Dabei werden die zuvor auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine unter Anlegen einer elektrischen Spannung auf eine auf der Anodenseite platzierte PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid) transferiert. Im zuvor zugegebenen Transferpuffer wandern die Proteine hierbei aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode und werden so auf die Polymerschicht der Membran übertragen (vgl. Abb. 2.2).



Abb. 2.2: Aufbauschema eines Immunoblots

Die Proteine auf der Membran können mit Ponceau-S-Färbelösung detektiert werden um die Übertragungseffizienz zu beurteilen.

Durch Blockierung der Membran mit einem Proteingemisch (z.B. Milchpulver in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS)) werden unspezifische Antikörper-Bindungsstellen der Membran belegt. Anschließend wird die Membran mit für das gesuchte Protein spezifischen Antikörpern inkubiert (Primärantikörper) und, nach einem Waschschrift zur Entfernung nicht spezifisch gebundene Antikörper, mit einem enzymgekoppelten Zweit-Antikörper (Sekundärantikörper) inkubiert. Dieser ist für den Primärantikörper spezifisch, z.B. gegen Maus-Immunglobulin gerichtet, wenn monoklonale Maus-Antikörper als Primärantikörper verwendet werden. Bei dem hier verwendeten Enzym handelt es sich um die *horseradish peroxidase* (Merrettichperoxidase, HRP), die ein Chemilumineszenz-Substrat umsetzt, wobei Licht emittiert wird. Diese Lichtemission kann entweder mit einer Kamera direkt gemessen oder auf einen Film aufgenommen werden (vgl. Abb. 2.3).

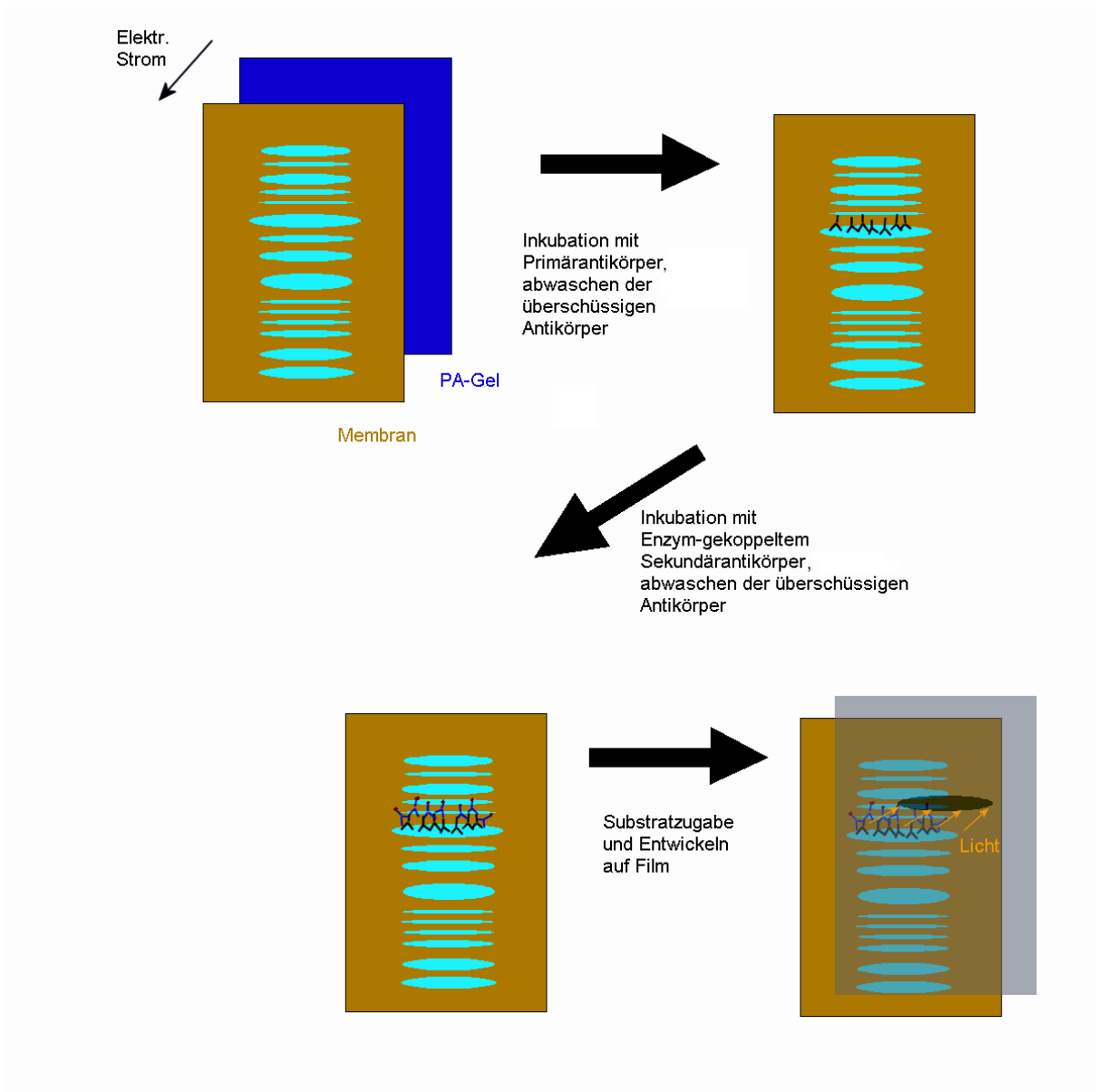


Abb. 2.3: Schematische Darstellung eines Immunoblots.

Anhand der Intensität des Signals kann semiquantitativ die Menge des Proteins bestimmt werden. Dabei wird gewöhnlich die Intensität auf das Signal eines sog. *housekeeping*-Gens normalisiert, das von der untersuchten Zelllinie im Allgemeinen unabhängig von Außeneinflüssen auf konstant hohem Niveau exprimiert wird. Hierfür bieten sich z.B. die zellulären Stützproteine α -Tubulin oder Aktin an.

Es wurden *Whatman*-Filterpapiere und eine PVDF-Membran entsprechend der Größe des Gels zurechtgeschnitten. Die Filter wurden kurz in Transferpuffer, die PVDF-Membran kurz in Methanol getränkt. Anschließend wurden für den Blot zunächst drei Lagen Filterpapier, dann das PAGE-Gel, die PVDF Membran und erneut drei Lagen Filter luftblasenfrei auf die Kathodenplatte aufgelegt (Abb. 2.2).

Die Zelllysate wurden mit 40 mA max. Stromfluss (=0,8 mA / cm² Gelfläche) über 60 min auf die Membran übertragen, anschließend wurde diese 10 min in H₂O hydriert, kurz in Methanol gewaschen und mit Ponceau-S-Färbelösung gefärbt. Das Gel ist in einigen Fällen zur Überprüfung der Bloteffizienz mit *Coomassie-Blue* gefärbt worden. Die Membran wurde in H₂O entfärbt und in 2% Blotto 1 h bei Raumtemperatur blockiert. In einem geeigneten Gefäß wurde die Membran mit 12 ml 1% Blotto und 1,6 µl MCM-3-Antiserum (affinitätsgereinigtes Kaninchen-Anti-MCM3-Serum, Verdünnung 1:7.500) über Nacht (14-17 h) bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 1,2 µl monoklonale α-Tubulin-Antikörper (Maus-IgG, Verdünnung 1:10.000) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran zunächst 5 bis 6 mal für 5-10 min in Tris-gepufferter Salzlösung mit Zusatz von Tween Detergenz (TBS-T) gewaschen, dann in 12 ml frischem Blotto mit 1,5 µl polyklonalem Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Verdünnung 1:8.000) und 2,4 µl polyklonalem Anti-Maus-IgG-Antikörper (1:2 vorverdünnt, Verdünnung insgesamt 1:10.000) für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von 5 bis 6 weiteren Waschschritten in TBS-T. In einer Dunkelkammer wurde dann das Lumineszenz-Substrat (West Pico) auf die Membran aufgetragen und 5 min inkubiert. Die Membran wurde auf einen Film aufgelegt und der Film nach 30-120 s Expositionszeit entwickelt. Der entwickelte Film wurde mit einer Kamera fotografiert und mit *GeneTools*® und *MS-Excel*® densitometrisch ausgewertet. Dabei wurde das Verhältnis des MCM3-Signals zu dem Signal des *housekeeping*-Gens α-Tubulin bei der Kontrolle als "100%" definiert und die Singale der zu vergleichenden Proben jeweils auf diese Banden bezogen.

2.2.8 Methyltetrazolium- (MTT-)Test

Der MTT-Test beruht auf dem Nachweis der Bildung von violett gefärbten Formazan-Kristallen aus gelbgefärbtem Methyltetrazolium (MTT) durch die Aktivität der zellulären Reduktionsäquivalente Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) und Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) sowie durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase in vitalen eukaryotischen Zellen. Diese Umsetzung lässt sich kolorimetrisch bestimmen und ist ein Maß für die Zahl vitaler Zellen in der untersuchten Zellprobe.

Von den zu vergleichenden Zellproben wurden 48 h nach erfolgter Transfektion auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte jeweils 2000 Zellen pro Vertiefung in 100 µl DMEM +10% FCS als Quadruplikate plattiert. Nach weiteren 96 h Inkubation (144 h nach Transfektion) wurden jeweils 10 µl einer 5,5 mM MTT-Lösung zu den Zellen ins Medium gegeben (Endkonzentration 0,5 mM) und die Platte 2 h bei 37°C / 5% CO₂

inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die an vitale Zellen adhärenen Formazan-Kristalle wurden 10-20 min bei Raumtemperatur in Isopropanol / 0,1 M HCl gelöst. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte bei 590 nm die Hintergrundextinktion wurde bei 660 nm gemessen.

2.2.9 Statistik

Messwerte wurden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Alle Versuche wurden mindestens zweifach wiederholt.

3. Ergebnisse

3.1 Effizienz der siRNA-Transfektion von humanen U87MG-Glioblastom-zellen mit verschiedenen Liposomentypen

Mit Hilfe von FITC-markierten siRNAs und einem EGFP-Plasmid wurde die optimale Transfektionsmethode festgelegt und überprüft. Die Beurteilung der Transfektionseffizienz erfolgte mikroskopisch. Dabei wurde eine Transfektionseffizienz von 80-90% der untersuchten Zellen bei der siRNA-Transfektion, und eine Effizienz von ca. 70-80% der untersuchten Zellen bei der transienten Plasmid-Transfektion nachgewiesen (Abb. 3.1). Es ließ sich hier eine starke zytotoxische Wirkung der EGFP-Transfektion beobachten. Bei der Transfektion des MCM3-Plasmids "pIS1" oder der siRNA zeigte sich dagegen unter den jeweils gewählten Transfektionsbedingungen höchstens eine geringgradige bzw. keine zytotoxische Wirkung durch den Transfektionsvorgang selbst. Die Versuche mit FITC-markierter siRNA waren für siRNA-Konzentrationen unter 100 nM aufgrund zu geringer Intensität der Fluoreszenz nicht mehr auswertbar.

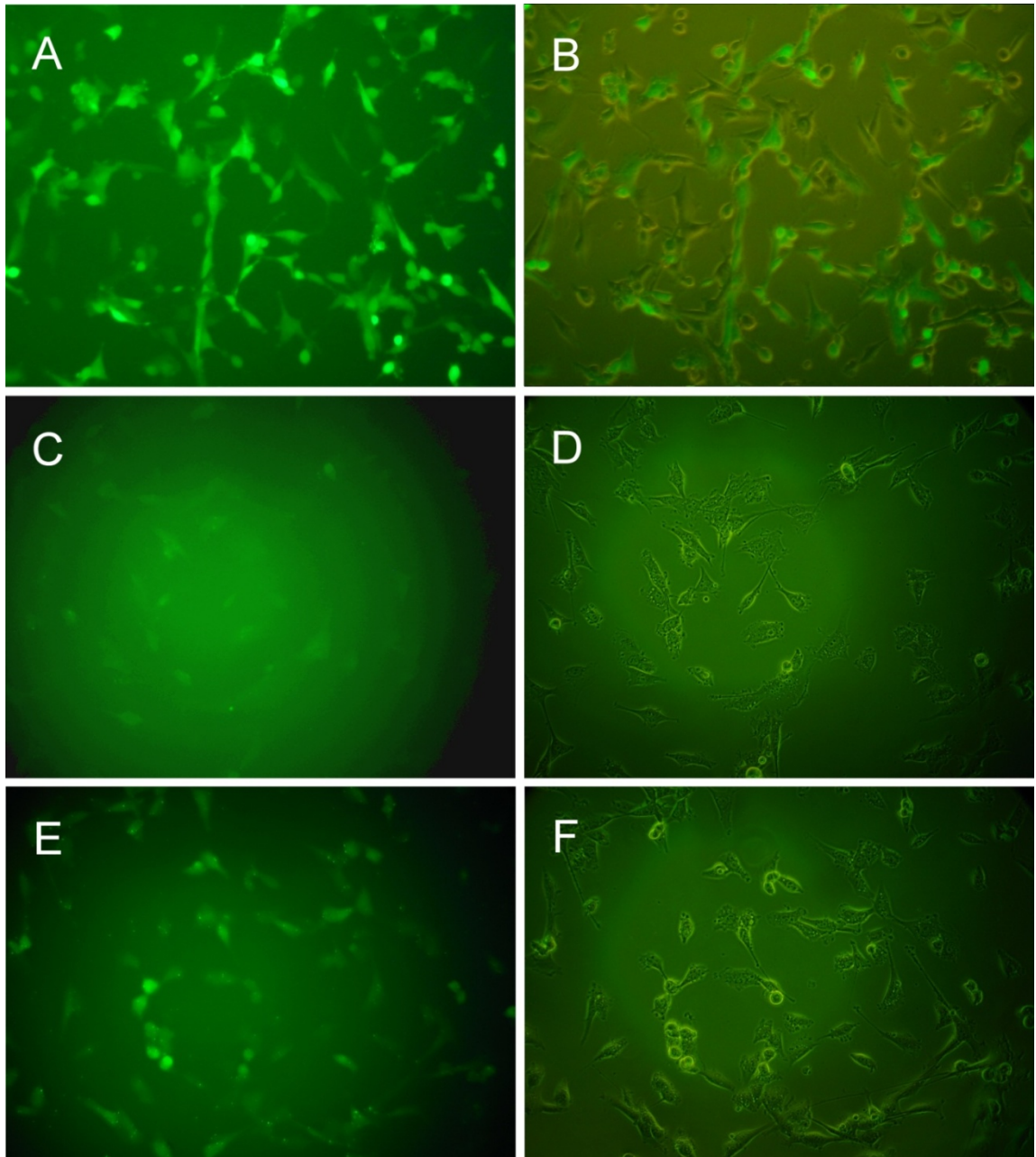


Abb. 3.1: Humane U87MG Glioblastomzellen, UV-Fluoreszenz-Mikroskopie; links Fluoreszenzaufnahmen (A, C, E), rechts Phasenkontrast (B, D, F); A, B: Transfektion von 2 µg EGFP-Plasmid mit 2,5 µl *Lipofectamine 2000*; C, D: Transfektion von 100 nM FITC-Kontrolle (K1) mit 7,5 µl *Lipofectamine RNAiMAX*; E, F: Transfektion von 100 nM FITC-Kontrolle (K1) mit 2,5 µl *Lipofectamine 2000*; 400x vergrößert.

3.2 Beobachtungen bei der Zellmikroskopie

3.2.1 Humane U87MG-Glioblastomzellen

Beobachtungen bei mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen

Für die Versuche mit den Kontroll-siRNAs "K2" (Dharmacon) und "K3" (MWG) (Identische siRNA-Sequenz, Konzentrationen von 10 bis 100 nM) war lichtmikroskopisch kein Unterschied hinsichtlich der Morphologie zwischen Kontroll-siRNA-transfizierten und untransfizierten U87MG-Zellen sichtbar.

Bei mit der entsalzten siRNA "K1" (Konzentrationen von 5 bis 100 nM) transfizierten U87MG-Zellen zeigten sich ab einer Konfluenz der Zellen von ca. 80% und einer siRNA-Konzentration von 30 nM vermehrt trauben- bzw. haufenförmig gelagerte Zellen mit vermehrtem Zelltod im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Abb. 3.2).

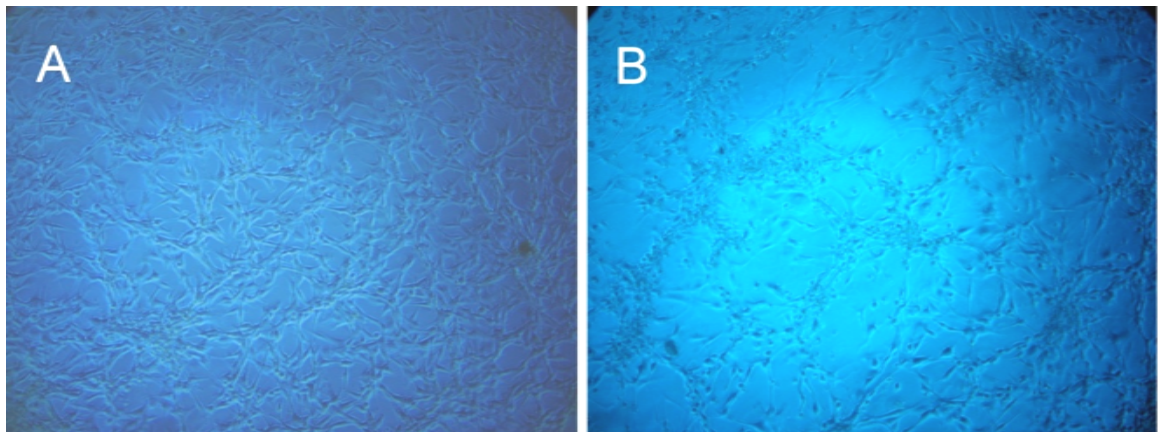


Abb. 3.2: Lichtmikroskopie von humanen U87MG-Zellen 96h nach Transfektion. A: untransfizierte U87MG Zellen; B: Morphologisch veränderte U87MG Zellen nach Transfektion von 40 nM Kontrolle "K1"; 400x vergrößert.

Beobachtungen bei mit den MCM3-siRNAs "1", "2" und Kontroll-siRNA "K1" transfizierten Zellen

Bei Transfektionsversuchen mit den entsalzten MCM3-siRNAs "1" und "2" zeigte sich konzentrationsabhängig eine vermehrte Zahl toter Zellen im Medium. Dies wurde ab einer Konzentration von 10 nM beobachtet (Konzentrationen von 5 bis 100 nM; Abb. 3.3).

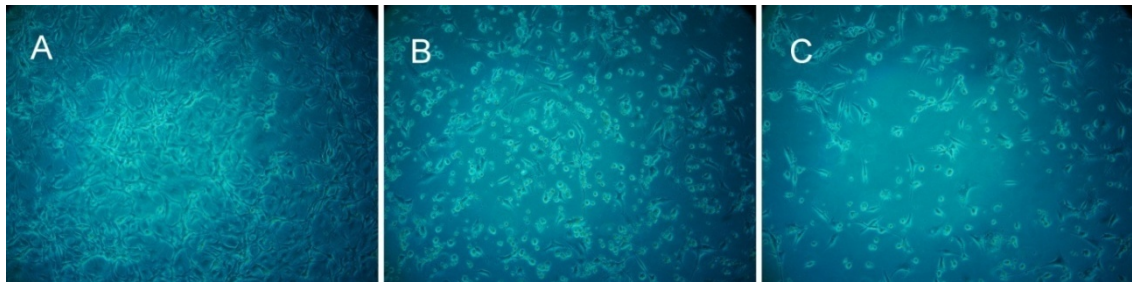


Abb. 3.3: Lichtmikroskopie von humanen U87MG-Zellen 96 h nach Transfektion. Vermehrter Zelltod nach Transfektion von 30 nM siRNA; A: Kontrolle "K1"; B: MCM3-siRNA "1"; C: MCM3-siRNA "2"; siRNAs entsalzt; 400x vergrößert.

Für die durch eine HPLC-Reinigung in höherer Reinheit vorliegenden Versionen dieser siRNAs zeigten sich bei den transfizierten U87MG-Zellen massive zytotoxische Effekte. Zusätzlich zeigten sich auch bei mit der HPLC-gereinigten Kontrolle "K1" (Konzentrationen 0,1 bis 100 nM) transfizierten Zellen deutlich konzentrationsabhängige zytotoxische Effekte. Bei mit der Kontrolle "K2" bei identischem Versuchsaufbau (10 bis 100 nM) transfizierten Zellen traten diese Effekte nicht auf (Abb. 3.4).

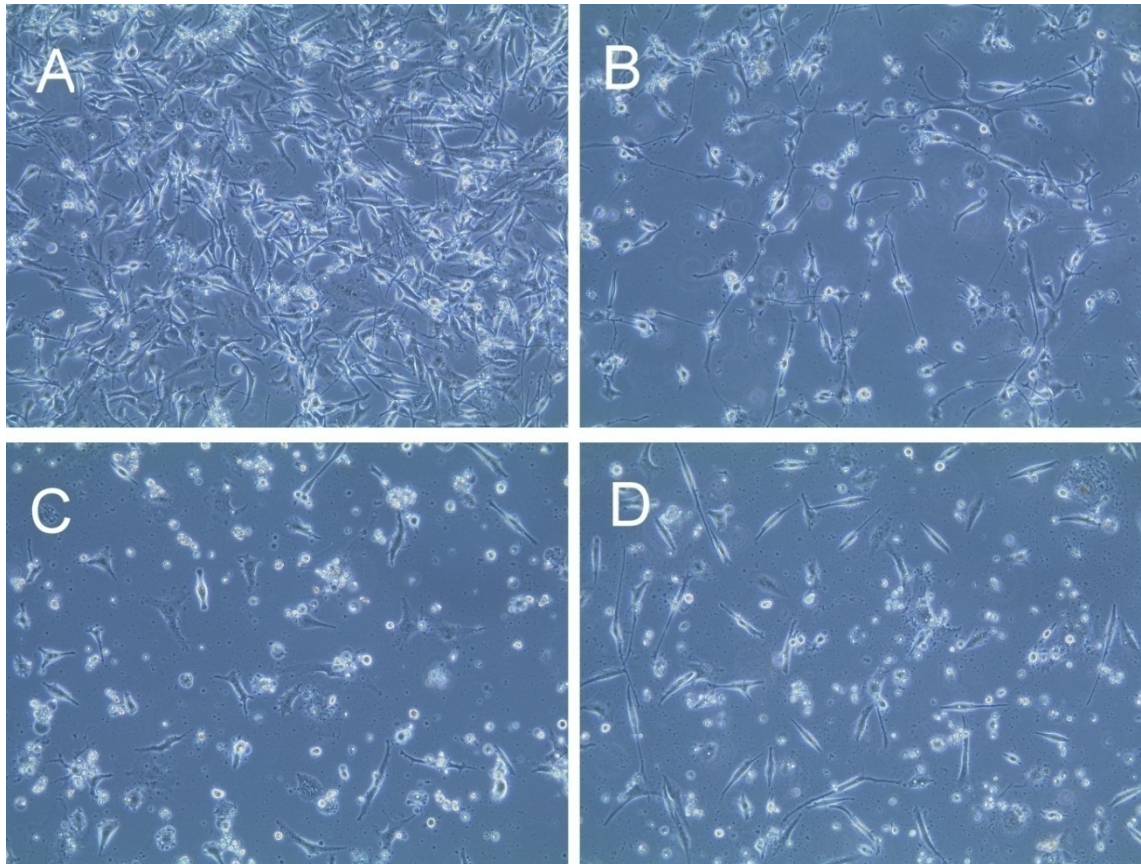


Abb. 3.4: Lichtmikroskopie 96 h nach Transfektion humaner U87MG-Zellen mit je 10 nM siRNA (HPLC-gereinigt). Vermehrter Zelltod.; A: Kontrolle "K2"; B: Kontrolle "K1"; C: MCM3-siRNA "1"; D: MCM3-siRNA "2"; 400x vergrößert.

Beobachtungen bei mit den MCM3-siRNAs "10" und "13" transfizierten Zellen

Für die MCM3-siRNA "10" zeigte sich bei den transfizierten U87MG-Zellen hinsichtlich Wachstum, Zelltod und Morphologie keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle "K3" (Konzentration 100 nM). Bei mit der MCM3-siRNA "13" (getestete Konzentrationen von 0,1 bis 100 nM) transfizierten U87MG-Zellen zeigten sich bereits 48 h nach Transfektion eine stark veränderte Zellmorphologie mit großem, weitläufigem Zytoplasma und weniger der sonst bei U87MG-Zellen typischen Pseudopodien. Außerdem waren hier eine große Zahl zellulärer Granulae sowie stark prominente, nukleolenreiche Zellkerne auffällig (Abb.3.5). Auch für siRNA-Konzentrationen von 1 nM und weniger ließen sich diese phänotypischen Veränderungen bei einzelnen Zellen noch beobachten.

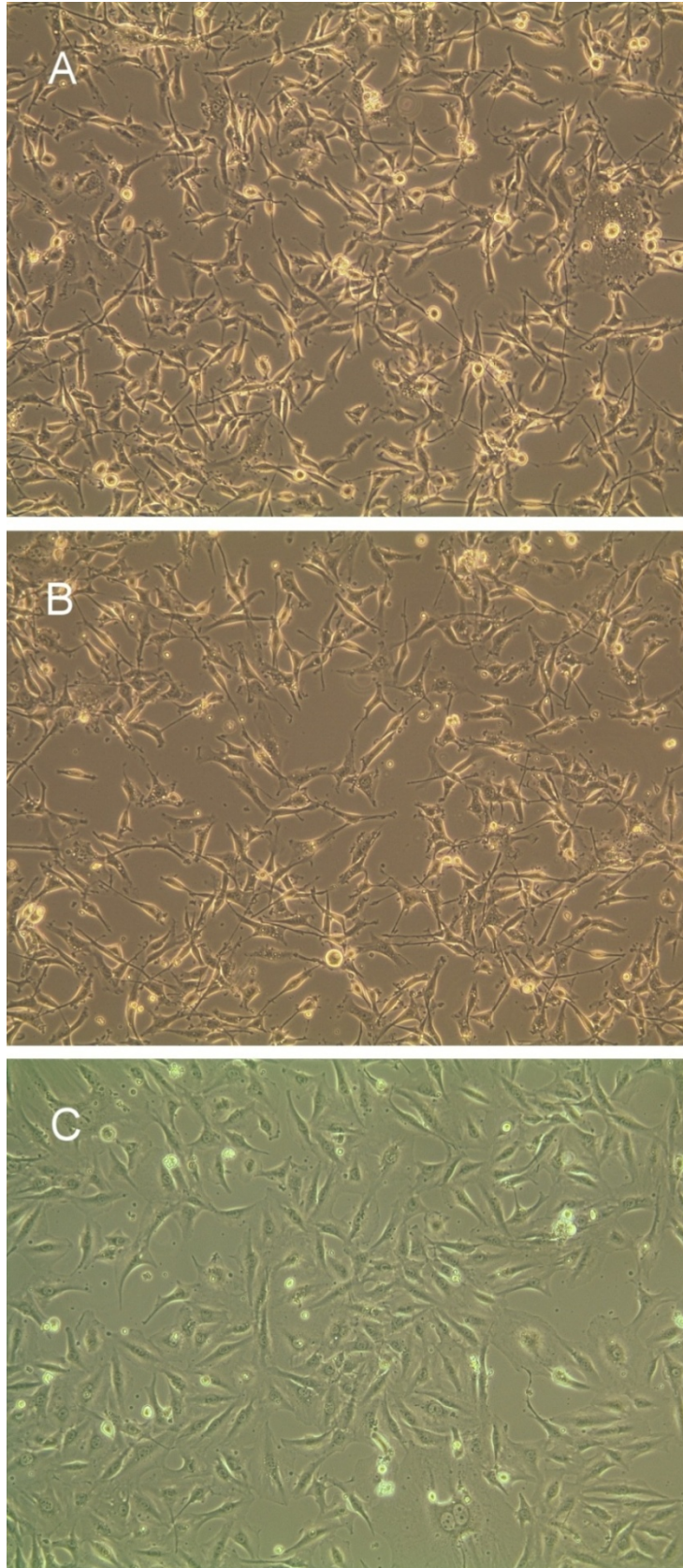


Abb. 3.5: Lichtmikroskopie humaner U87MG-Glioblastomzellen 96 h nach Transfektion mit je 100 nM siRNA,; A: Kontrolle "K3"; B: MCM3-siRNA "10"; C: MCM3-siRNA "13", auffällig in C die großen Zellkörper und prominenten Zellkerne mit Nukleoli; 400x vergrößert.

Um den durch zu große Zelldichte begrenzten Beobachtungszeitraum zu verlängern, wurden der Versuch wiederholt und die Zellen 72 h nach Transfektion bei niedrigerer Dichte erneut ausgesät. Dabei ließ sich bei den mit der MCM3-siRNA "13" transfizierten U87MG-Zellen auch ein vermindertes Wachstum im Vergleich zur Kontrolle beobachten (Abb. 3.6).

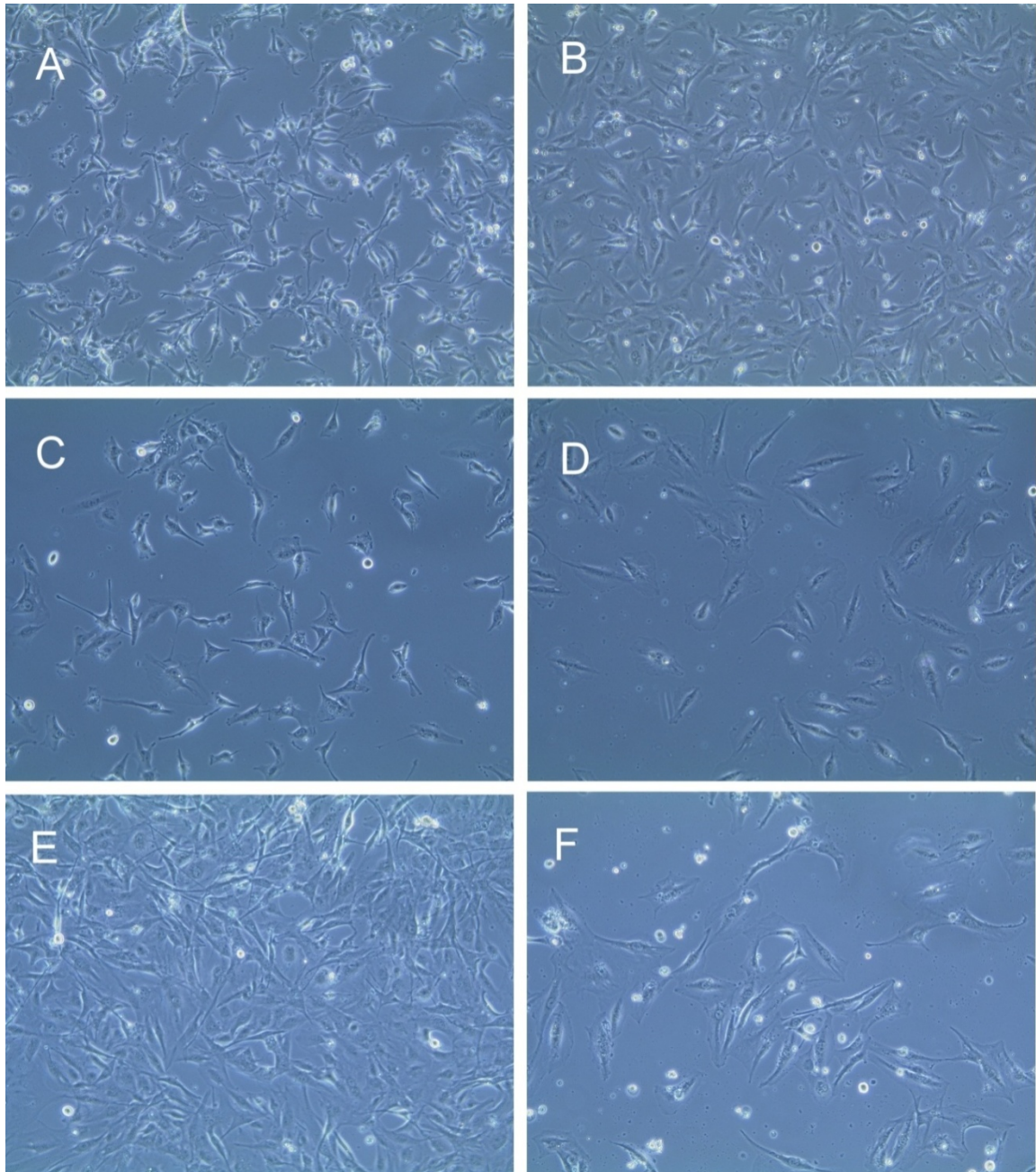


Abb. 3.6: Lichtmikroskopie humaner U87-MG-Zellen. Morphologische und proliferative Unterschiede der Zellen nach Transfektion mit je 10 nM siRNA; A, C, E Kontrolle "K3", B, D, F MCM3-siRNA "13"; A und B 48 h, C und D 96 h, E und F 168 h nach Transfektion; Neuaussaat der Zellen 72 h nach Transfektion mit einer Zellzahl von 50×10^3 Zellen pro Vertiefung; 400x vergrößert.

Beobachtungen bei mit der MCM3-siRNA "3'UT" transfizierten Zellen

Mit der siRNA "3'UT", die auch für die *plasmid-rescue*-Versuche verwendet wurde (s.u.), wurden ebenfalls Versuche mit erneuter Aussaat der Zellen 72 h nach Transfektion durchgeführt. Dabei zeigte sich bei den transfizierten U87MG-Zellen im Vergleich zu MCM3-siRNA "13" ab einer Konzentration von 10 nM eine ähnlich veränderte Morphologie der Zellen wie bei mit der MCM3-siRNA "13" transfizierten U87MG-Zellen. Die Effekte traten jedoch im Vergleich zu mit der MCM3-siRNA "13" transfizierten Zellen um 24-48 h verzögert auf und die beobachtete Hemmung der Proliferation fiel weniger stark aus (Konzentrationen 0,1 bis 100 nM; Abb. 3.7).

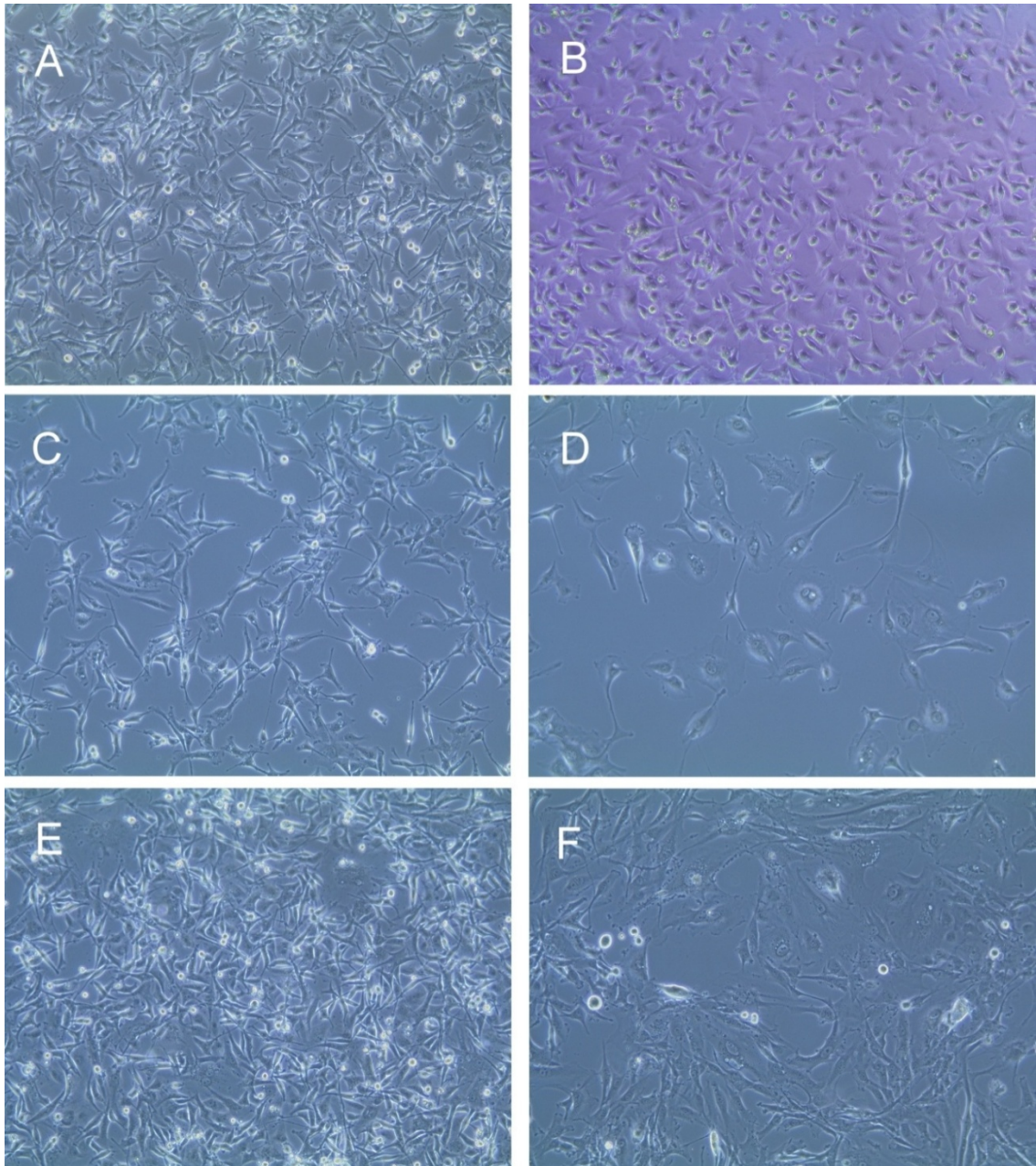


Abb. 3.7: Lichtmikroskopie humaner U87-MG-Zellen. Morphologische und proliferative Veränderungen nach Transfektion mit je 30 nM siRNA; A, C, E Kontrolle "K2", B, D, F MCM3-siRNA "3'UT"; A und B 48 h, C und D 96 h, E und F 168 h nach Transfektion; Neuaussaat 72 h nach Transfektion mit 50×10^3 Zellen pro Vertiefung; 400x vergrößert;

Beobachtung der Zellen bei *plasmid-rescue*-Versuchen

Um mit größtmöglicher Sicherheit *off-target*-Effekte auszuschließen (1.4.2, 1.4.3), wurde ein *plasmid-rescue*-Versuch mit MCM3-siRNA "3'UT" und dem MCM3-Plasmid "pIS1" durchgeführt.

Es wurden hierfür humane U87MG-Glioblastomzellen mit folgenden Nukleinsäuren transfiziert und über 96 h beobachtet:

1. 30 nM Kontroll-siRNA "K2"
2. 0,85 mg/l MCM3-Plasmid-DNA "pIS1"
3. 30 nM MCM3-siRNA "3'UT"
4. 30 nM MCM3-siRNA "3'UT" und 0,85 mg/l MCM3-Plasmid-DNA "pIS1".

Dabei zeigte sich bei den mit dem MCM3-Plasmid "pIS1" transfizierten U87MG-Zellen keinerlei Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Bei den nur mit 30 nM der MCM3-siRNA "3'UT" transfizierten Zellen zeigte sich auch hier der bei mit dieser siRNA transfizierten Zellen zuvor beobachtete Effekt (große, plump wirkende Zellkörper, prominente Zellkerne).

Bei den mit 30 nM der MCM3-siRNA "3'UT" und dem MCM3-Plasmid "pIS1" kointrotransfizierten Zellen ließen sich die gleichen Veränderungen wie bei den nur mit der MCM3-siRNA "3'UT" transfizierten Zellen beobachten. Der durch die Transfektion der MCM3-siRNA hervorgerufene Effekt wurde durch die gleichzeitige Plasmid-Transfektion in einem Beobachtungszeitraum von 96 h nicht aufgehoben.

3.2.2 Humane U251-Glioblastomzellen

Mit 10 nM der MCM3-siRNA "13" transfizierte U251 Zellen zeigten keinerlei mikroskopisch sichtbare Veränderungen im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA „K3“ oder nicht transfizierten humanen U251-Glioblastomzellen.

3.3 Immunoblot

Nachweis von MCM3 und α -Tubulin

Anhand von Ponceau S-Färbung und Immunoblot-Versuchen mit Proteinlysate unbehandelter Zellen konnte gezeigt werden, dass die Methode einen gleichmäßigen Proteintransfer gewährleistet und die Detektion von MCM3 und α -Tubulin im Immunoblot für verschiedene Proteinmengen ausreichend funktioniert (Abb. 3.8 und 3.9).

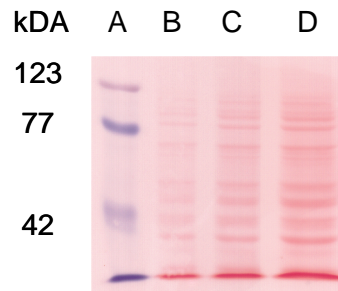


Abb. 3.8: Ponceau-S-Färbung einer PVDF-Membran. U87MG-Zelllysate in verschiedenen Proteinmengen nach Auftrennen in einem Polyacrylamidgel und Transfer auf eine PVDF-Membran; Molekulargewichtsstandard Roti®-Mark prestained; A = Standard; B = 5 µg; C = 10 µg; D = 20 µg Proteinlysate. Gleichmäßiges Bild der Banden.



Abb. 3.9: Immunoblot-Nachweis von MCM3 und α -Tubulin. U87MG-Zelllysate, aufgetragen wurden: A = 5 µg; B = 10 µg; C = 20 µg Zelllysate.

3.3.1 MCM3-Suppression bei humanen U87MG-Glioblastomzellen

Suppression von MCM3 in Abhängigkeit verschiedener MCM3-spezifischer siRNA-Sequenzen

Für fünf verschiedene MCM3-siRNA-Sequenzen wurde deren Effektivität bei der MCM3-Suppression untersucht. Alle siRNAs wurden zunächst mit 100 nM eingesetzt und im Immunoblot die MCM3-Suppressionsstärke verglichen. Dabei zeigte sich für die MCM3-siRNAs "13" und "3'UT" mit MCM3-Suppressionswerten von über 90% die stärkste MCM3-Suppression.

Um das Risiko für das Auftreten von *off-target*-Effekten zu minimieren wurden die eingesetzten siRNA-Konzentrationen in separaten Versuchen soweit reduziert dass noch kein deutliches Abfallen der gemessenen MCM3-Suppression auftrat. Für die MCM3-siRNA "13" lag diese effektivste siRNA-Konzentration bei 10 nM (Abb. 3.10 und 3.11)

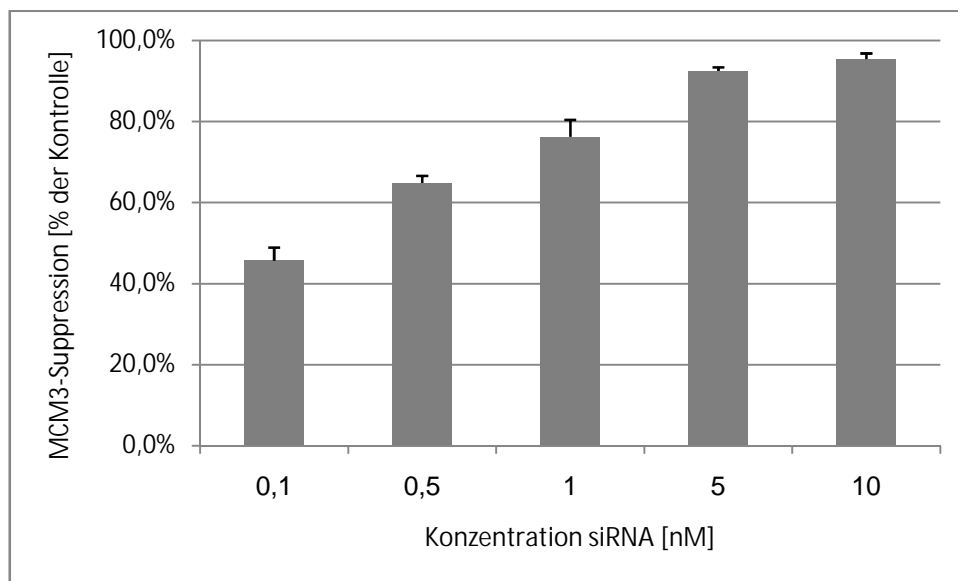


Abb. 3.10: Korrelation der Konzentration der MCM3-siRNA "13" mit dem Ausmaß der MCM3-Suppression bei humanen U87MG-Glioblastomzellen, Zellyse 96 h nach Transfektion mit siRNA "13"; Kontrolle: siRNA "K3" 10 nM. Auswertung im Immunoblot. Mittelwerte, Fehler als Standardabweichung.

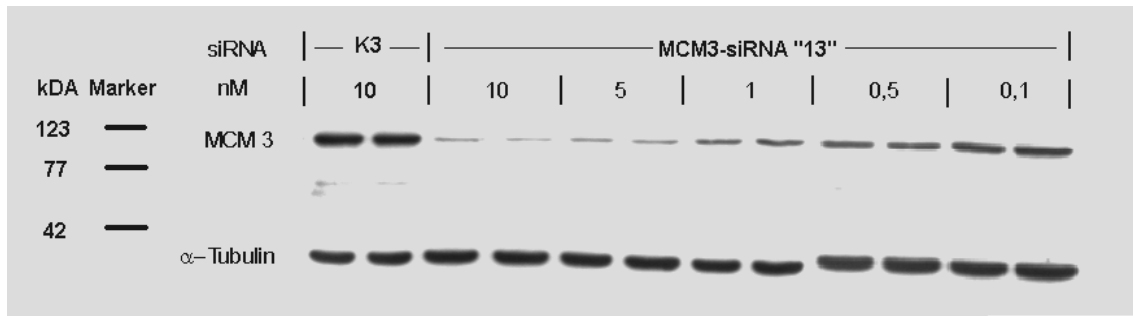


Abb.3.11: Immunoblot-Nachweis von MCM 3 und α -Tubulin, mit je zwei verschiedenen Proben durchgeführter Versuch; verschiedene Konzentrationen von MCM3-siRNA "13", Kontrolle: siRNA "K3" 10 nM; humane U87MG-Glioblastomzellen, Zelllyse 96 h nach Transfektion.

Analog wurde für die MCM3-siRNA "3'UT" die effektivste Konzentration bei 30 nM bestimmt (Abb. 3.12).

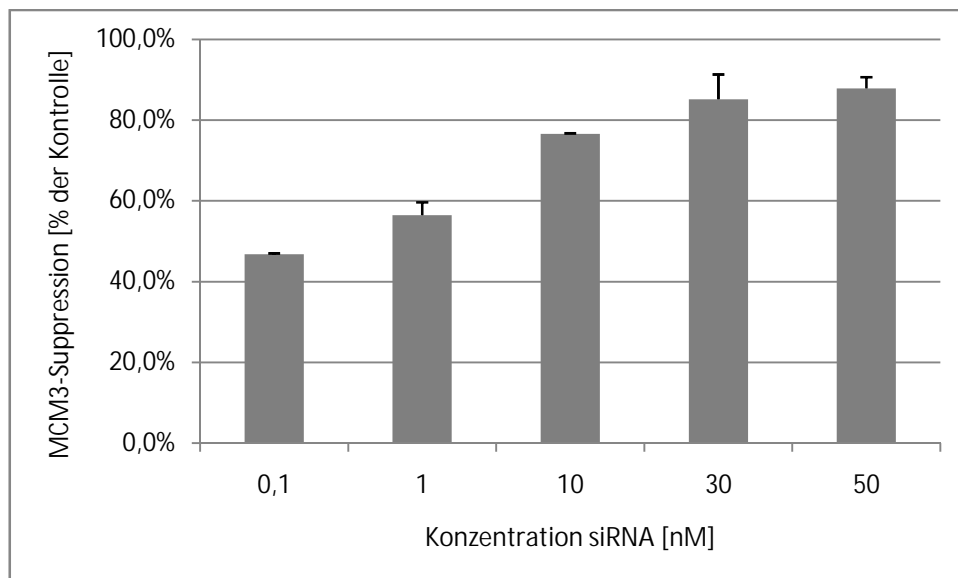


Abb. 3.12: Korrelation der Konzentration der MCM3-siRNA "3'UT" mit dem Ausmaß der MCM3-Suppression bei humanen U87MG-Glioblastomzellen, 96 h nach Transfektion mit MCM3-siRNA "3'UT"; Kontrolle: siRNA "K2" 50 nM; Auswertung im Immunoblot. Mittelwerte, Fehler als Standardabweichung.

Für die MCM3-siRNAs "1" und "2" wurde die effektivste Konzentration bei 30 nM bestimmt, für die MCM3-siRNA "10" bei 100 nM. Für diese siRNAs zeigte sich dabei auch in den jeweils effektivsten Konzentrationen eine deutlich geringere MCM3-Suppression als bei den MCM3-siRNAs "13" und "3'UT" (Abb. 3.13).

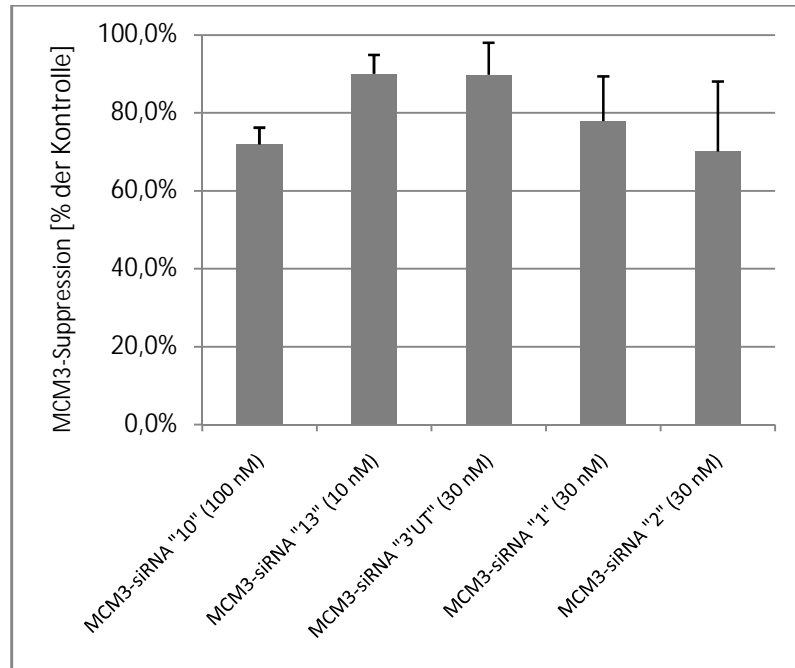


Abb. 3.13: Vergleich der Effektivität der MCM3-Suppression für verschiedene siRNA-Sequenzen im Immunoblot. Eingesetzt wurden die jeweils effektivsten MCM3-siRNA-Konzentrationen; humane U87MG-Glioblastomzellen, Zellyse 96 h nach siRNA-Transfektion; Mittelwerte, Fehler als Standardabweichung.

Zeitabhängige MCM3-Suppression durch MCM3-siRNA "13"

Für die MCM3-siRNA "13" wurde die Korrelation der MCM3-Suppression mit der Zeit nach erfolgter Transfektion in 24h-Intervallen im Immunoblot untersucht, als Endpunkt wurde 120 h nach Transfektion gewählt. Dabei zeigte sich 48 h nach Transfektion eine MCM3-Suppression von $30,8 \pm 10,5\%$, ab 72 h nach Transfektion von über 90% (Abb. 3.14 und 3.15)

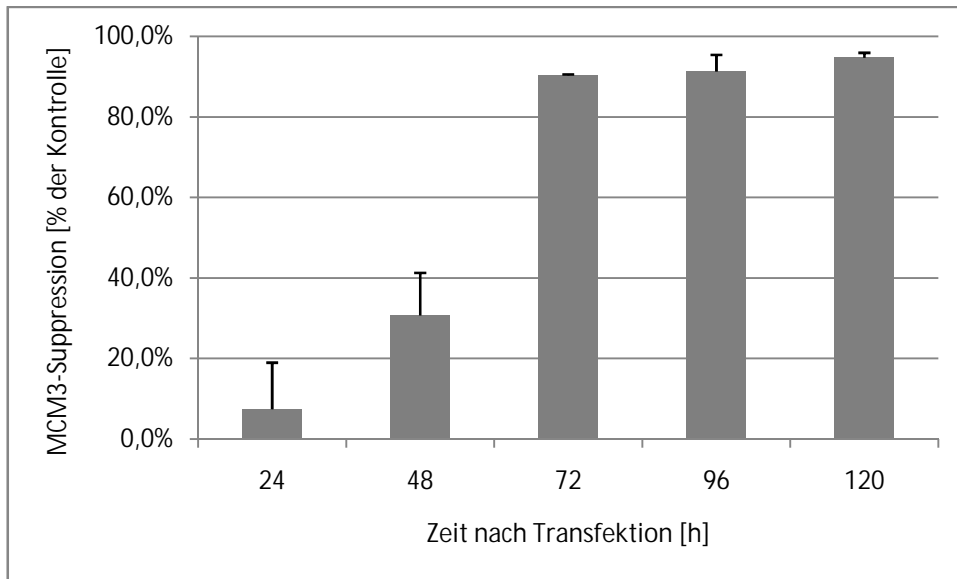


Abb. 3.14: Korrelation der Zeit nach erfolgter Transfektion mit der MCM3-Suppression bei humanen U87MG-Glioblastomzellen, Immunoblot-Analyse von Zelllysaten in 24h-Intervallen nach Transfektion mit 10 nM MCM3-siRNA "13"; Kontrolle: 10 nM siRNA "K3"; Mittelwerte, Fehler als Standardabweichung.

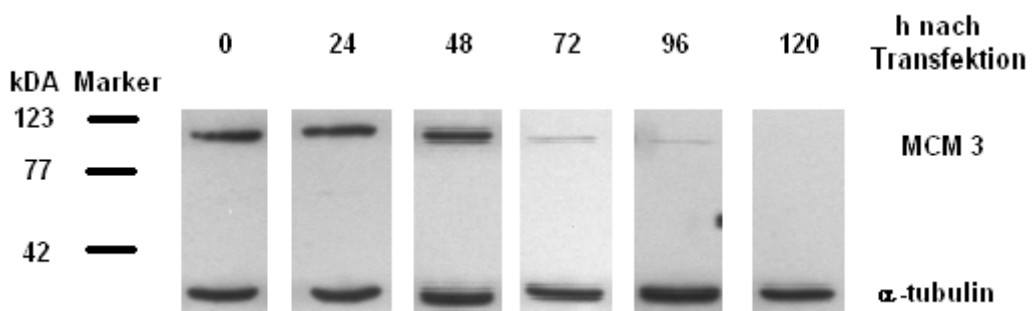


Abb. 3.15: Immunoblot mit Zelllysaten humaner U87MG-Glioblastomzellen; Immunoblot-Analyse in 24h-Intervallen nach Transfektion der Zellen mit 10 nM MCM3-siRNA "13".

Plasmid-rescue-Versuch mit MCM3-Plasmid "pIS1"

Auch für die *plasmid-rescue*-Versuche bei humanen U87MG-Zellen wurde eine Immunoblot-Analyse 96 h nach Transfektion durchgeführt, dabei wurde analog zu 3.2.1 getrennt voneinander transfiziert:

1. 30 nM Kontroll-siRNA "K2"
2. 0,85 mg/l MCM3-Plasmid-DNA "pIS1"
3. 30 nM MCM3-siRNA "3'UT"
4. 30 nM MCM3-siRNA "3'UT" und 0,85 µg/ml MCM3-Plasmid-DNA "pIS1".

Das MCM3-Niveau der mit 30 nM der Kontrolle "K2" transfizierten Zellen wurde als "100%" definiert. Bei den nur mit 0,85 µg/ml des MCM3-Plasmids transfizierten Zellen wurde das MCM3-Proteinniveau mit $209,9 \pm 10,1\%$ etwa auf das Doppelte dieses Kontroll-Niveaus angehoben. Das MCM3-Proteinniveau bei nur mit 30 nM MCM3-siRNA transfizierten Zellen lag bei $22,7 \pm 6,9\%$ der Kontrolle. Bei der Kotransfektion von MCM3-siRNA und dem MCM3-Plasmid "pIS1" wurde die MCM3-Expression mit $115,9 \pm 0,5\%$ der MCM3-Expression der Kontroll-transfizierten Zellen leicht über Kontroll-Niveau angehoben (Abb. 3.16), der Verlust der endogenen MCM3-Synthese durch plasmid-codiertes MCM3 also ausgeglichen.

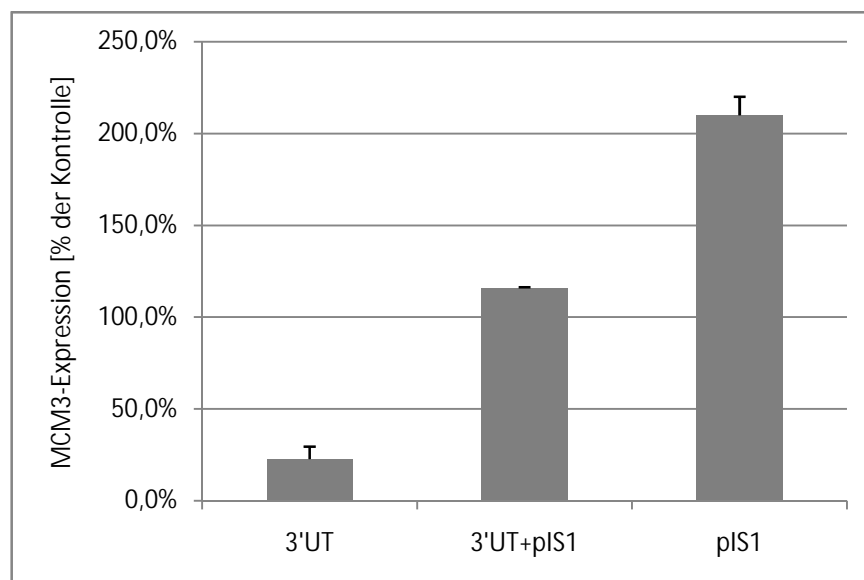


Abb. 3.16: *Plasmid-rescue*-Versuch; Niveau der MCM3-Expression 96h nach Transfektion mit 30 nM MCM3-siRNA "3'UT" und 0,85mg/l MCM3-Plasmid "pIS1"; Kontrolle: 30 nM siRNA "K2"; Auswertung im Immunoblot. Mittelwerte, Fehler als Standardabweichung.

3.3.2 MCM3-Suppression bei humanen U251-Glioblastomzellen

Bei der Transfektion von humanen U251-Glioblastomzellen mit 10 nM MCM3-siRNA "13" wurde 96 h nach Transfektion eine MCM3-Suppression von $57,4 \pm 3,7\%$ im Vergleich zum MCM3-Spiegel nach Transfektion von 10 nM Kontroll-siRNA "K3" erreicht. Diese erreichte relative MCM3-Suppression lag damit deutlich unter den für humane U87MG-Glioblastomzellen erreichten Werten von $90,0 \pm 4,9\%$.

3.4 MTT-Test von mit den MCM3-siRNAs "13" und "3'UT" transfizierten humanen U87MG-Glioblastomzellen

Bei dem zur Messung der Zellproliferation durchgeführten MTT-Test mit humanen U87MG-Zellen zeigte sich eine verringerte optische Dichte (OD) bei den mit den MCM3-siRNAs "13" und "3'UT" transfizierten Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen "K3" und "K2". Diese betrug bei mit 10 nM MCM3-siRNA "13" transfizierten Zellen 144 h nach Transfektion $22,0 \pm 5,9\%$ der Kontrolle, bei mit 30 nM MCM3-siRNA "3'UT" transfizierten Zellen $70,8 \pm 16,3\%$ der Kontrolle. Die Transfektion dieser siRNAs hatte also eine verringerte Proliferation der untersuchten humanen U87MG-Zellen zur Folge, dabei wurde die Proliferation der Zellen durch die Transfektion mit MCM3-siRNA "13" stärker unterbunden als durch die Transfektion mit MCM3-siRNA "3'UT" (Abb. 3.17).

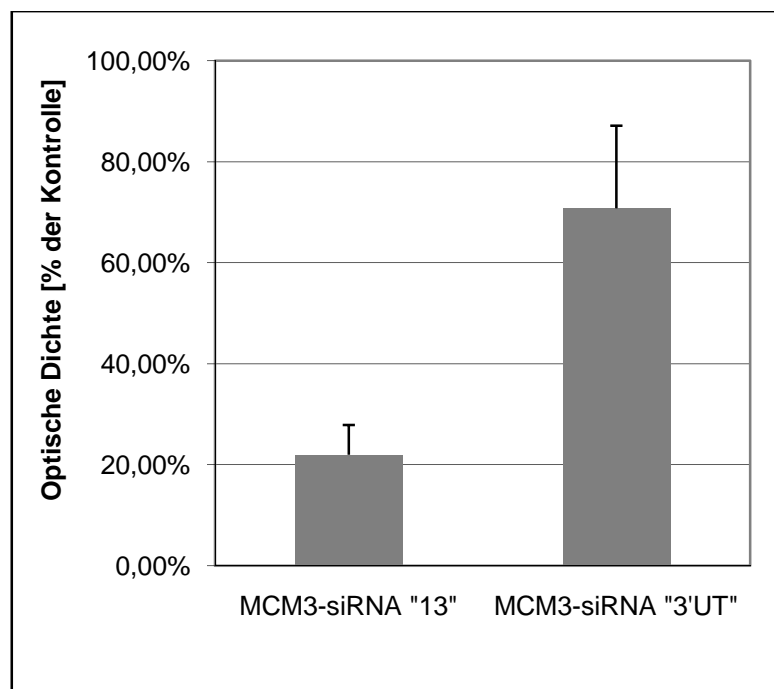


Abb. 3.17: Analyse der Proliferation humaner U87MG-Zellen im MTT-Test, 144h nach Transfektion mit 10 nM MCM3-siRNA "13" bzw. 30 nM MCM3-siRNA "3'UT". Mittelwerte, Standardabweichung.

4. Diskussion

Es konnte hier gezeigt werden, dass eine Suppression von *Minichromosome Maintenance Protein 3* bei humanen U87MG-Zellen durch RNA-Interferenz möglich ist. Dabei zeigten sich abhängig von der siRNA-Sequenz jedoch unterschiedliche Effekte: Einerseits wurde für die MCM3-siRNA-Sequenzen "13" und "3'UT" eine morphologische Veränderung der transfizierten Zellen und eine Proliferationshemmung im MTT-Test beobachtet (Abb. 3.5-7), auf der anderen Seite zeigte sich für die mit den MCM3-siRNA-Sequenzen "1" und "2" sowie mit der Kontroll-siRNA "K1" transfizierten Zellen ein massiv vermehrtes Zellsterben im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Abb. 3.4). Dabei korrelierte die unterschiedliche Qualität der Effekte nicht mit dem Ausmaß der MCM3-Proteinsuppression. Dies wirft die Frage auf, welche der hier beobachteten Effekte tatsächlich durch eine MCM3-Proteinsuppression ausgelöst wurden und welche als *off-target*-Effekte zu werten sind. Angesichts der Tatsache, dass RNA-Interferenz-Versuche aufgrund der zahlreichen möglichen Fehlerquellen leicht missinterpretiert werden können [28], sollen hier nun zunächst für die MCM3-Suppression spezifische von unspezifischen Effekten abgegrenzt werden. Dabei dient neben den Kontroll-siRNAs in erster Linie die MCM3-siRNA "10" als Referenz, da sie im Rahmen der hier durchgeführten Versuche bei einer MCM3-Suppression von $71,9 \pm 4,3\%$ im Vergleich zur Kontrolle keinerlei Lichtmikroskopisch sichtbaren Effekt auf die transfizierten humanen U87MG-Zellen hatte.

4.1 Unterscheidung zwischen MCM3-spezifischen Effekten und *off-target*-Effekten

Vor allem für die siRNAs "1", "2" und "K1" besteht der Verdacht, dass die durch die siRNA-Transfektion entstandenen Effekte *off-target*-Effekte sind: Betrachtet man die Werte der MCM3-Suppression aller MCM3-siRNAs bei Zellyse 96 h nach Transfektion (Abb. 3.13) zeigt sich, dass die MCM3-siRNAs "13" und "3'UT" mit einer MCM3-Suppression von mehr als 90% des Kontrollwertes die höchsten Werte aufwiesen. Bei Versuchen mit den MCM3-siRNA-Sequenzen "1" und "2" wurden dagegen bei deutlich höherer Dosierung mit $77,9 \pm 11,5\%$ ("1") bzw. $70,1 \pm 18,0\%$ ("2") des Kontrollwertes erheblich niedrigere, mit der MCM3-siRNA "10" ($71,9 \pm 4,3\%$) vergleichbare Suppressionswerte erreicht (vgl. Abb. 3.7).

Dass die Transfektion dieser MCM3-siRNAs Zelltod als Effekt zeigte, ohne dass unabhängig von der verwendeten MCM3-siRNA eine Korrelation zur gemessenen MCM3-Suppression bestand schließt eine MCM3-Abhängigkeit dieses Effektes praktisch aus.

Stattdessen sind die durch Transfektion der MCM3-siRNAs "1" und "2" hervorgerufenen Effekte als unspezifische *off-target*-Effekte zu werten [27,28], ebenso die durch die Kontroll-siRNA "K1" verursachten Effekte.

Es stellt sich nun die Frage, ob die bei den übrigen MCM3-siRNAs "13" und "3'UT" beobachteten Effekte, morphologisch veränderte humane U87MG-Zellen und eine verlangsamte Proliferation, ebenfalls *off-target*-Effekte sein könnten.

Dabei ließen sich bei den mit den MCM3-siRNAs ("13" und "3'UT") transfizierten U87MG-Zellen nach 96 h die oben genannten morphologischen Veränderungen bei MCM3-Suppressionen von über 90% der Kontrolle feststellen. Dieser Wert liegt deutlich über dem Niveau der durch MCM3-siRNA "10" bewirkten MCM3-Suppression von $71,9 \pm 4,3\%$ der Kontrolle, die noch keine Veränderungen auslöste. Eine Abhängigkeit des beobachteten Effektes von der MCM3-Suppression ist hier also im Unterschied zu den siRNAs "1" und "2" klar möglich.

Auffällig ist allerdings die Tatsache, dass die für U87MG-Zellen mittels Immunoblot nachgewiesene MCM3-Suppression der MCM3-siRNA "13" bei 0,1 und 1 nM nicht deutlich über der erreichten Suppression mit der MCM3-siRNA "10" lag (Abb. 3.10), obwohl sich auch bei diesen eher niedrigen Werten der MCM3-Suppression morphologisch veränderte Zellen (plumper Zellkörper, prominente Nukleolen) zeigten. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass sich mikroskopisch bei niedrigeren Konzentrationen der MCM3-siRNA "13" deutlich vermehrt morphologisch unveränderte U87MG-Zellen beobachten ließen und daher diese – möglicherweise aufgrund der sehr geringen siRNA-Menge nicht ausreichend transfizierten – Zellen das Messergebnis verfälschen können. Zudem kann bei derart geringen siRNA-Konzentrationen eine homogene siRNA-Transfektion nicht durch Versuche mit FITC-markierter siRNA gesichert werden, da diese Versuche bei solch niedrigen Konzentrationen nicht mehr Lichtmikroskopisch auswertbar sind. Bei der MCM3-siRNA "10", die ausschließlich in hohen Dosen (100 nM) verwendet wurde, ist dagegen anhand der Fluoreszenz-Versuche (3.1) von einer gleichmäßigen siRNA-Transfektion auszugehen.

Weiterhin fällt auf, dass bei dem *plasmid-rescue*-Versuch, in dem die MCM3-siRNA "3'UT" und das MCM3-Plasmid "pIS1" sowohl jeweils einzeln als auch zusammen in die selben humanen U87MG-Zellen transfiziert wurden, der durch die MCM3-siRNA hervorgerufene Effekt (prominente Zellkerne, vergrößerte Zellkörper, nukleolenreiches Plasma) sich durch Ko-Transfektion des MCM3-Plasmids anders als bei einem klar MCM3-siRNA-spezifischen Effekt zu erwarten wäre nicht aufheben ließ. Der *plasmid-rescue*-Versuch kann hier also *off-target*-Effekte nicht klar ausschließen. Es ist

allerdings denkbar, dass die durch die MCM3-siRNA-Transfektion ausgelösten Effekte z.B. durch einen Zellzyklusarrest über den p53-Signalweg irreversibel sind [35,36,37]. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten morphologischen Veränderungen der U87MG-Zellen nur vorübergehend waren bzw. zu einem späteren Zeitpunkt rückläufig gewesen wären, da der Beobachtungszeitraum mit 96 h hier relativ kurz war. Weiterhin ist als Erklärung hierfür denkbar, dass der durch die Plasmid-Transfektion ausgelöste Anstieg der MCM3-Expression nicht schnell genug einsetzt, um dem siRNA-Effekt entgegen zu wirken.

Zusammenfassend kann der *plasmid-rescue*-Versuch also weder ausschließen noch bestätigen, dass die beobachteten MCM3-siRNA-Wirkungen spezifisch durch die nachgewiesene MCM3-Suppression ausgelöst wurden.

Andererseits lassen sich morphologische Veränderungen der U87MG-Zellen (große Zellkörper, prominente Zellkerne) auch bei geringen siRNA-Konzentrationen von 1 nM ("13") bzw. 10 nM ("3'UT") und Proteinsuppressionen von $76,19 \pm 4,21\%$ ("13") bzw. $76,63 \pm 0,11\%$ ("3'UT") 96 h nach siRNA-Transfektion beobachten, teilweise sogar bei noch niedrigeren Konzentrationen. In aktuellen Publikationen, die sich mit RNA-Interferenz beschäftigen, werden für Transfektionsversuche üblicherweise siRNA-Konzentrationen von 10 bis 100 nM eingesetzt [38,39]. Daher ist der beobachtete Effekt auf den Phänotyp der Zellen bei den hier verwendeten sehr geringen siRNA-Konzentrationen zum einen ein Indiz für die Effektivität der siRNA, zum anderen sind bei solch geringen siRNA-Konzentrationen *off-target*-Effekte unwahrscheinlich [30]. Auch wären bei *off-target*-Effekten weniger differenzierte Veränderungen zu erwarten, wie sie sich z.B. für die MCM3-siRNAs "1" und "2" beobachten ließen [28].

Auch die Tatsache, dass mit zwei verschiedenen MCM3-siRNAs unterschiedlicher Hersteller (MCM3-siRNAs "13" und "3'UT") die gleichen Veränderungen erreicht werden, macht eine unspezifische Wirkung sehr unwahrscheinlich [25,30].

Weiterhin wurde die MCM3-siRNA "13" von Seiten des Herstellers (Firma Dharmacon) mit der *On-Target*-Modifikation versehen, die das Risiko des Auftretens von *off-target*-Effekten für diese siRNA schon von vornherein deutlich reduziert [25].

Insgesamt ist unter Abwägung aller vorliegenden Ergebnisse anzunehmen, dass die Transfektion mit den MCM3-siRNAs "13" und "3'UT" die beschriebenen morphologischen Veränderungen (3.2) und die Verringerung der Proliferationsrate (3.4) durch die Suppression von MCM3 über RNA-Interferenz spezifisch auslöst, die für diese MCM3-siRNAs beobachteten Effekte sind also nicht als *off-target*-Effekte zu werten. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, sind allerdings weitere Versuche sinnvoll.

So könnte ein Nachweis der durch die Transfektion von MCM3-siRNA ausgelösten Veränderungen auf RNA-Ebene z.B. durch *Real-Time*-RT-PCR oder RNA-*Microarrays* hier weitere Erkenntnisse bringen. Auch ein veränderter *plasmid-rescue*-Versuch, z.B. mit anderen Untersuchungszeitpunkten, oder veränderten Plasmid-DNA-Mengen könnte hierzu beitragen, zumal ein erfolgreicher *plasmid-rescue*-Versuch als optimal zum Ausschluss von *off-target*-Effekten bei siRNA-Versuchen gilt [29,30].

Geht man nun davon aus, dass die beobachteten Veränderungen des zellulären Phänotyps und der Proliferationsrate der mit den MCM3-siRNAs "13" und "3'UT" transfizierten humanen U87MG-Zellen MCM3-spezifisch sind, so stellt sich die Frage wie diese Veränderungen zu erklären sind.

4.2 Morphologie, Proliferation und Zelltod bei mit den MCM3-siRNAs "13" und "3'UT" transfizierten humanen U87MG-Zellen

Auffällig sind zunächst die beobachteten Veränderungen des Phänotyps der mit MCM3-siRNA "13" und "3'UT" transfizierten Zellen: ein großes, weitläufiges Zytoplasma, das Fehlen von Zellfortsätzen und die prominenten Zellkerne. Stuermer et al. (2007) beschrieben ähnliche Veränderungen durch die MCM3-Suppression bei Mausfibroblasten (NIH-3T3) und führen diese u.a. auf Veränderungen in der mikrotubulären Organisation während der Zytokinese zurück. Sie wiesen v.a. einen Einfluss der MCM3-Konzentration auf die Organisation der γ -Tubulin-Proteine nach, dabei handelt es sich um für die zelluläre Stützfunktion und den intrazellulären Transport wichtige Eiweiße [16]. Ein Einfluss auf die Proliferation der Zellen wurde hierbei nicht untersucht.

Andere Autoren [35,36,40] beschreiben solche Veränderungen des Phänotyps, u.a. auch für humane U87MG-Zellen, als *senescence-like* (Seneszenz-ähnlich). Derartige Veränderungen treten demnach auf, wenn eine Zelle irreversibel in den Zellzyklusarrest übergeht, speziell für den durch p53 vermittelten Zellzyklusarrest wird dies beschrieben [35,36,41]. Eine indirekte Wirkung von MCM3 über p53, eventuell durch die ATM-Proteinkinase vermittelt, ist als Erklärung für die hier beobachteten morphologischen Veränderungen daher denkbar [21,37].

Ein solcher Übergang der transfizierten U87MG-Zellen durch die Suppression von MCM3 in den Zellzyklusarrest erklärt auch die durch die Transfektion der MCM3-siRNAs "13" und "3'UT" ausgelöste und im MTT-Test bestimmte Proliferationshemmung (3.3), da sich Zellen im Zellzyklusarrest nicht weiter teilen [41]. Auch dass bei den p53-mutierten humanen U251-Glioblastomzellen keine derartigen morphologischen Veränderungen auftreten, ließe sich hierdurch erklären. Allerdings

kann dies auch auf die verhältnismäßig geringere MCM3-Proteinsuppression ($57,4 \pm 3,7\%$) zurückzuführen sein, daher sollte für weitere Versuche mit dieser Zelllinie wenn möglich zunächst die MCM3-Suppression weiter verbessert werden.

Ein vermehrtes Auftreten von Zellsterben war im untersuchten Zeitraum von max. 7 Tagen nach Transfektion bei den erfolgreich mit den MCM3-siRNAs "10", "13" und "3'UT" transfizierten humanen U87MG-Glioblastomzellen nicht zu beobachten, was ebenfalls im Einklang mit der Hypothese eines Übergangs der Zellen in die Seneszenz steht.

Die Hypothese, dass die U87MG-Zellen unter der Wirkung von MCM3-siRNAs in den Zellzyklusarrest übergehen, sollte mit anderen Methoden überprüft werden. Als Nachweis hierfür eignen sich z.B. seneszenz-assoziierte Marker, wie die *senescence-associated-beta-galactosidase* (seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase).

4.3 Schlussfolgerung und Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses, den die Suppression des in humanen Astrozytomen verstärkt exprimierten *minichromosome maintenance* Protein 3 bei humanen Glioblastomzellen hat.

Es konnte hier gezeigt werden, dass die erfolgreiche MCM3-Suppression in humanen U87MG-Glioblastomzellen mit den MCM3-siRNAs "13" und "3'UT" eine Veränderung der zellulären Morphologie in Form von vergrößerten Zellkörpern, prominenten Zellkernen und einem Fehlen der bei U87MG-Zellen sonst typischerweise vorhandenen Zellfortsätze verursacht, was dem von anderen Autoren beschriebenen *senescence-like-phenotype* (seneszenz-ähnlichem Phänotyp) entspricht [35,36,40]. Außerdem kann durch die MCM3-Suppression eine deutliche Verlangsamung der Proliferation dieser Zellen nach 144 h erreicht werden, die im MTT-Test nachgewiesen wurde. Dabei konnte für diese Zellen kein durch die MCM3-Suppression hervorgerufenen vermehrtes Zellsterben beobachtet werden.

Bei den untersuchten humanen U251-Glioblastomzellen führte die MCM3-Suppression durch RNA-Interferenz zu keiner sichtbaren morphologischen Veränderung, wobei im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden konnte, ob dieser Unterschied durch den mutierten p53-Status dieser Zelllinie oder andere Ursachen bedingt ist.

Für ein abschließendes Urteil zu den hier gewonnenen Erkenntnissen sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Literaturverzeichnis

- [1] S. K. Nicolis: Cancer Stem Cells and “Stemness” Genes in Neuro-Oncology. *Neurobiology of Disease*. 2007; 25: 217-229.
- [2] H. Ohgaki, P. Kleihues: Population-Based Studies on Incidence, Survival Rates, and Genetic Alterations in Astrocytic and Oligodendroglial Gliomas. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2005; 64(6): 479-489.
- [3] L. Kasper et al.: *Harrisons Innere Medizin – deutsche Ausgabe*, 16. Auflage, ABW-Wissenschaftsverlag. 2005; Bd. 2: 2642-43.
- [4] R. Stupp, A.F. Hottinger: Management of Malignant Glioma – Quo Vadis. *Onkologie*. 2008; 31: 300–302.
- [5] D. Maiorano et al.: MCM Proteins and DNA Replication. *Current Opinion in Cell Biology*. 2006; 18:130-136.
- [6] P. Korkolopoulou et al.: Minichromosome Maintenance Proteins 2 and 5 Expression in Muscle-Invasive Urothelial Cancer: a Multivariate Survival Study Including Proliferation Markers and Cell Cycle Regulators. *Human Pathology*. 2005; 36: 899-907.
- [7] S. S. Li et al.: Replicative MCM7 Protein as a Proliferation Marker in Endometrial Carcinoma: a Tissue Microarray and Clinico-Pathological Analysis. *Histopathology*. 2005; 46: 307-313.
- [8] E. C. Obermann et al.: Expression of Minichromosome Maintenance Protein 2 as a Marker for Proliferation and Prognosis in Diffuse Large B-cell Lymphoma: A Tissue Microarray and Clinico-Pathological Analysis. *Biomed Central Cancer*. 2005; 5: 162.
- [9] V. Padmanabhan et al.: DNA Replication Regulation Protein MCM7 as a Marker of Proliferation in Prostate Cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 2004; 57: 1057-62.
- [10] A. Freeman et al.: Minichromosome Maintenance Proteins as Biological Markers of Dysplasia and Malignancy. *Clinical Cancer Research*. 1999; 5: 2121-2132.
- [11] A. Gonzalez et al.: Minichromosome Maintenance Protein 2 Is a Strong Independent Prognostic Marker in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2003; 21(23): 4306-4313.
- [12] C. Schrader et al.: Minichromosome Maintenance Protein 6, a Proliferation Marker Superior to Ki67 and Independent Predictor of Survival in Patients with Mantle Cell Lymphoma. *British Journal of Cancer*. 2005; 93: 939-943.
- [13] K. Stoeber et al.: Diagnosis of Genito-Urinary Tract Cancer by Detection of Minichromosome Maintenance 5 Protein in Urine Sediments. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002; 94(14): 1071-9.
- [14] A. Soeling et al.: Minichromosome Maintenance Protein 3 Elicits a Cancer-Restricted Immune Response in Patients with Brain Malignancies and Is a Strong Independent Predictor of Survival in Patients with Anaplastic Astrocytome. *Clinical Cancer Research*. 2005; 11: 249-258.
- [15] C. Musahl et al.: Stability of the Replicative Mcm3 Protein in Proliferating and Differentiating Human Cells. *Experimental Cell Research*. 1998; 241: 260-64.
- [16] A. Stuermer et al.: Mouse Pre-Replicative Complex Proteins Colocalise and Interact with the Centrosome. *European Journal of Cell Biology*. 2007; 86: 37-50.
- [17] W. Osman et al.: Functional Interaction Between the Glucocorticoid-Receptor and GANP/MCM3AP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006; 348(4): 1239-1244.
- [18] Y. Takei et al.: The MCM3 Acetylase MCM3AP Inhibits Initiation, but not Elongation, of DNA Replication via Interaction with MCM3. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277: 43121–43125.
- [19] B. Schories et al.: Characterization of Apoptosis-Induced Mcm3 and Cdc6 Cleavage Reveals a Proapoptotic Effect for One Mcm3 Fragment. *Cell Death and Differentiation* 2004; 1-3.
- [20] K. Czornak et al.: Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair. *Journal of Applied Genetics*. 2008; 49(4): 383-396.

- [21] Y. Shi et al.: Identification of Carboxyl-Terminal MCM3 Phosphorylation Sites Using Polyreactive Phosphospecific Antibodies. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282(12): 9236-43.
- [22] S. Bialik et al.: A high throughput proteomics screen identifies novel substrates of death-associated protein kinase. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2008; 7(6): 1089-98.
- [23] A. Fire et al.: Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature*. 1998; 391: 806-811.
- [24] G. Liu et al.: Development of New RNAi Therapeutics. *Histology and Histopathology*. 2007; 22: 211-217.
- [25] O. Snøve, J.J. Rossi: Chemical Modifications Rescue Off-Target Effects of RNAi. *ACS Chemical Biology*. 2006; 1(5): 274-6.
- [26] A. L. Jackson et al.: Widespread siRNA "Off-Target" Transcript Silencing Mediated by Seed Region Sequence Complementarity. *RNA*. 2006; 12: 1179-1187.
- [27] L. Aagaard, J.J. Rossi: RNAi therapeutics: Principles, Prospects and Challenges.
- [28] M. Robbins et al.: Misinterpreting the Therapeutic Effects of Small Interfering RNA Caused by Immune Stimulation. *Human Gene Therapy*. 2008; 19: 991–999. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007; 59(2-3): 75–86.
- [29] M. Sarov, A.F. Stewart: The Best Control for the Specificity of RNAi. *Trends in Biotechnology*. 2005; 23(9): 446-8.
- [30] Unbekannter Autor: Whither RNAi? *Nature Cell Biology*. 2003; 5(6): 489-90.
- [31] C.X. Li et al.: Delivery of RNA Interference. *Cell Cycle*. 2006; 18: 2103-2109.
- [32] J.J. Rossi: A Cholesterol Connection in RNAi. *Nature*. 2004; 432: 155-6.
- [33] C. Shen et al.: Gene Silencing by Adenovirus-Delivered siRNA. *FEBS Letters*. 2003; 539: 111-114.
- [34] E. Song et al.: Antibody Mediated in Vivo Delivery of Small Interfering RNAs via Cell-Surface Receptors. *Nature Biotechnology*. 2005; 23: 709-717.
- [35] B.D. Chang et al.: Role of p53 and p21waf1/cip1 in Senescence-Like Terminal Proliferation Arrest Induced in Human Tumor Cells by Chemotherapeutic Drugs. *Oncogene*. 1999;18(34): 4808-18.
- [36] Y. Hirose et al.: p53 Effects Both the Duration of G₂/M Arrest and the Fate of Temozolomide-Treated Human Glioblastoma Cells. *Cancer Research*. 2001; 61(5): 1957-63.
- [37] V. Srsen et al.: Inhibition of Centrosome Protein Assembly Leads to p53-Dependent Exit From the Cell Cycle. *The Journal of Cell Biology*. 2006; 174(5): 625-30.
- [38] R. Navakanit et al.: Growth Inhibition of Breast Cancer Cell Line MCF-7 by siRNA Silencing of Wilms Tumor 1 Gene. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 2007; 90(11): 2416-21.
- [39] Y. Shi et al.: Inhibition of Gene Expression of SARS Coronavirus by Synthetic Small Interfering RNAs. *Cell Research*. 2005; 15(3): 193-200.
- [40] E. Morandi et al.: Gene Expression Time-Series Analysis of Camptothecin Effects in U87MG and DBTRG-05 Glioblastoma Cell Lines. *Molecular Cancer*. 2008; 7: 66.
- [41] N. Ohtani et al.: Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging. *Cancer Science*. 2009; 100(5): 792-7.

Thesen

1. Gegen Minichromosome Maintenance Protein 3 gerichtete siRNAs können die Expression von MCM3 auf RNA und Proteinebene reduzieren.
2. Eine Transfektion von MCM3-siRNA "10" hat eine messbare Suppression von MCM3 zufolge. Unter den gewählten Bedingungen zeigt sich jedoch keinerlei lichtmikroskopisch erkennbarer Effekt bei U87MG Zellen.
3. Eine Transfektion von siRNAs der Sequenzen „1“, „2“, und „K1“ führt zu *off-target* Effekten mit der Folge von vermehrtem Zellsterben bei U87MG Zellen.
4. Eine Transfektion der MCM3-siRNAs "13" und "3'UT" führt zu morphologischen Veränderungen bei U87MG Zellen, diese ähneln dem bei anderen Autoren beschriebenen *senescence-like phenotype* (seneszenz-ähnlicher Phänotyp).
5. Eine Transfektion der MCM3-siRNAs "13" und "3'UT" führt zu einer im MTT-Test nachweisbaren Verringerung der Zellproliferation bei U87MG Zellen.
6. Eine Transfektion der MCM3-siRNAs "13" hat bei einer Suppression der Aktivität von MCM 3 unter den gewählten Versuchsbedingungen keinen mikroskopisch sichtbaren Effekt bei U251 Zellen.
7. Ein Plasmid-Rescue-Versuch mit MCM3-siRNA "3'UT" und dem transient transfizierten MCM3-Plasmid "pIS1" führt im Beobachtungszeitraum nicht zu einer Rückbildung der durch die siRNA "3'UT" verursachten Veränderungen bei U87MG Zellen.
8. Die morphologischen Veränderungen, die durch die Transfektion mit den MCM3-siRNAs "13" und "3'UT" hervorgerufen werden, sind spezifisch für die Suppression der intrazellulären MCM3-Aktivität durch diese siRNAs.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Karl Paul Willi Fengler
Adresse	Gräfestraße 18, Halle (Saale)
Geburtsdatum	21.07.1983
Geburtsort	Berlin
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

09/1993 – 06/2002	Gymnasium Steglitz, Berlin, Abschluss mit Abitur (Note 1,7)
-------------------	---

Studium

10/2003 – 11/2009	Studium der Humanmedizin, MLU Halle-Wittenberg
09/2005	1.Staatsexamen (Note 2,0)
10/2009 – 11/2009	2.Staatsexamen (Note 1,5)
11/2009	Approbation als Arzt

Promotion

10/2006 – 03/2007	Experimentelle Arbeiten im Neuroonkologischen Labor der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zum Thema: Molekulare Antagonisierung von MCM3 durch RNA-Interferenz bei Gliomen
-------------------	---

Halle (Saale), den 21.02.2011

Karl Fengler

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Weiterhin erkläre ich an Eides statt, dass ich bisher keinerlei frühere Promotionsversuche an der medizinischen Fakultät unternommen habe und dass ich diese Arbeit an keiner anderen Universität oder Fakultät zur Promotion eingereicht habe.

Halle (Saale), den 21.02.2011

Karl Fengler