

Karin Dobat
Dr. med.

Untersuchung von Unterschieden in der Expression zwischen G₁- und S-Phase an HeLa-Zellen mittels *differential display*-PCR und quantitativer PCR

Geboren am 28.06.1971 in Braunschweig

Allgemeine Hochschulreife am 05.05.1991 in Wolfenbüttel

Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover vom WS 1991-WS 2000

Ärztliche Vorprüfung am 17.09.1993 an der Medizinischen Hochschule Hannover

Klinisches Studium an der Medizinischen Hochschule Hannover

Praktisches Jahr in Braunschweig

Staatsexamen am 26.10.2000 an der Medizinischen Hochschule Hannover

AIP am Städtisches Klinikum, Braunschweig, Klinik für Neurochirurgie,

Promotionsfach : DKFZ

Doktorvater: Prof. Dr. N. Paweletz

Das Primärziel dieser Arbeit sollte es sein, mit *differential-display*-PCR durch Vergleich synchronisierten HeLa-Zellen spezifische Unterschiede im Expressionsmuster zu entdecken. Die Proteinprodukte dieser Unterschiede sind wahrscheinlich an der Zellzyklusregulation oder -progression beteiligt.

HeLa-Zellen wurden durch einen doppelten Thymidinblock in der G₁-Phase und der S-Phase synchronisiert. Die Kontrolle erfolgte durch Durchflußzytometrie. Aus den am besten synchronisierten Kulturen wurde die mRNA extrahiert. Die Qualität der RNA wurde durch Amplifikation eines CENP-C-Fragments aus dem 5'-Bereich überprüft.

Nach aufwendiger Optimierung konnten durch vergleichende DD-PCR-Reaktionen und elektrophoretische Auftrennung mehrere potentielle Expressionsunterschiede identifiziert werden. Diese Genfragmente können auch einen regulatorischen Bereich und somit entsprechende Bindungsmotive enthalten. Tatsächlich finden sich in einem Bruchstück (Klon6) Bindungsmotive für die G₁-Phase spezifischen Transkriptionsfaktoren E2F und SP1. Diese Stellen wurden weiter untersucht. Klon6 wurde in den promotorlosen Luciferase-Vektor pXP1 kloniert. In der transienten Transfektion zeigte sich eine leichte transkriptionelle Aktivität. Die Cotransfektion von Expressionsvektoren für E2F-1 und E2F-4 führte zu einer weiteren Aktivierung. Durch Gelretardierungsversuche konnte eine Bindungsstelle für SP1 nachgewiesen werden. Für die E2F-Bindungsmotive konnte nur eine spezifische DNA-Protein-Wechselwirkung dargestellt werden, ohne weitere Proteine im Komplex nachweisen zu können.

Mit Hilfe der DD-PCR ließen sich Unterschiede im Expressionsmuster darstellen. Mehrere wurden erfolgreich kloniert. Die Homologiesuche ergab keine Hinweise, so daß zur weiteren Charakterisierung eine RACE-PCR und Genbankscreening durchgeführt wurden. Hierdurch ergaben sich jedoch keine weitere Sequenzinformation. Die in Klon6 gefunden potentiellen Bindungsstellen für E2F und SP1 ließen sich in vitro nachweisen; auch eine mögliche Funktion als Promotor durch ein Reporterassay ließ sich darstellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß es sich bei Klon6 um eine 5'-UTRegion handelt. Damit wäre auch die phasenspezifische Expression möglich und somit das Ziel, eine unbekanntes zellzyklusphasenspezifisches Genfragment zu finden, erfüllt. Eine Aussage über mögliche Funktionen kann nicht getroffen werden. Möglich ist jedoch, daß es sich um einen weiteren Baustein in der Regulation des Zellzykluses handelt. Weitere Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich waren, könnten z.B. der Beweis der differentiellen Expression mittels *nuclear-runon-assay* sein.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Abhängigkeit der CENP-C-Expression in Abhängigkeit von pRb untersucht. Mit der mRNA aus unsynchronisierten BT549- und MCF-7-Zellen wurde eine kompetitive RT-PCR in einem dreifachen Ansatz durchgeführt. Nach der optischen Auswertung ergab sich bei Rb-defizienten BT549-Zellen eine CENP-C-Menge, die um das 5fach gesteigerte war gegenüber den nicht defizienten MCF-7-Zellen.

Dieses Ergebnis könnte auf eine Regulation von CENP-C durch pRb während der G₁-Phase hindeuten, so daß es theoretisch denkbar ist, daß CENP-C auch in dieser Zellzyklusphase eine Rolle spielt.