

Otto Mannherz
Dr. sc.hum.

Screening zur Identifizierung pro- und anti-apoptotischer Gene mittels reverser Transfektions-Zellarrays

Abschluß: Dipl.-Ing. (FH) Biotechnologie am 30.09.1999 an der Fachhochschule Mannheim Hochschule für Technik und Gestaltung

Promotionsfach: DKFZ

Doktorvater: Prof. Dr. Peter Lichter

Umgehung der Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus bei der Tumorentstehung und Tumorentwicklung. Die Identifizierung neuer pro- und anti-apoptotischer Gene ist von großer Bedeutung für das Verständnis der Entstehung von Tumoren und deren Therapie. In der hier vorgestellten Arbeit wurde ein auf reverser Transfektion basierender Assay zum Screening nach apoptotischen Körperchen genannt DARTA-Assay entwickelt, um neue pro-apoptotische Gene suchen und identifizieren zu können. Der alternative Screening-Ansatz durch Anwendung von TUNEL-Färbung erwies sich als ungeeignet, da nur wenige apoptotische Zellen erfasst wurden. Die Detektion apoptotischer Körperchen erbrachte dagegen verlässliche Ergebnisse, da eine apoptotische Zelle mehrere apoptotische Körperchen abschnürt, wodurch das Signal "Anzahl apoptotischer Objekte" verstärkt wird. Zum Testen des DARTA-Assays wurden 382 Gene mit größtenteils unbekannter Funktion untersucht. Zehn von 382 Genen waren in der Lage, Apoptose auszulösen. Eines von diesen zehn Genen war *ANTI*, von dem bereits bekannt war, dass es durch Überexpression Apoptose auslöst. Für sechs von den restlichen neun Genen wurde die Induktion von Apoptose zudem im TUNEL- und Nicoletti-Assay nachgewiesen. Eines der Gene war bisher nicht für eine apoptose-relevante Funktion annotiert (*ST6GALII*), während für die restlichen fünf noch keine Funktion bekannt war (*FLJ20551*, *CXORF12*, *FLJ11127*, *MGC8721*, *C19ORF4*). Alle sechs Gene lösten Apoptose durch Aktivierung von Caspasen aus. Zusätzlich zu den sieben Apoptose-induzierenden Genen bewirkten 19 weitere Gene verschiedene morphologische Veränderungen: Abrundung der Zellen, eingedellte Kerne, kleine kondensierte Zellkerne, große Nukleoli, kondensierte Chromosomen und Ausbildung zellulärer Fortsätze. Zur automatischen Auswertung von DARTA-Assays wurde ein Bildanalyseprogramm entwickelt, das auf der Segmentierung einer hochauflösenden Abbildung des Arrays basiert. Das Programm war in der Lage, EYFP- und Bax/EYFP-exprimierende Zellen auf dem Array zu unterscheiden. Nach anfänglichen Versuchsreihen zur Optimierung relevanter Parameter kann die Software routinemäßig zur Auswertung von RTZ-Arrays eingesetzt werden. Diese Plattform, bestehend aus reverser Transfektion und anschließender automatischer Auswertung von RTZ-Arrays über Segmentierungs-Software, welche die apoptotische Körperchen quantifiziert, ist eine potente Technik für die funktionelle Charakterisierung von Genen. Die Methode könnte wesentlich zur schnellen Aufklärung der Funktion der mehr als 18.000 Gene beitragen, denen bisher noch keine biologische Funktion zugewiesen werden konnte. Hierüber könnten wichtige Kandidatengene für diagnostische und therapeutische Anwendungen identifiziert werden.

Für das Screening nach anti-apoptotischen Proteinen wurde die RNAi-Technologie eingesetzt. Dabei werden durch *silencing* und Induktion von Apoptose anti-apoptotische Gene identifiziert. Zunächst wurden die drei *silencing*-Molekülgruppen siRNA, esiRNA und shRNA auf ihre Anwendbarkeit und Effizienz hin getestet. SiRNAs zeigten eine sehr hohe Effizienz beim Referenzgen EYFP. Zur Herstellung von esiRNAs wurden das Dicer-Enzym und RNase III

getestet. Die mit RNase III hergestellte esiRNA gegen EYFP zeigte keinen *silencing*-Effekt. esiRNAs gegen EYFP, *Vim* und *BCL2*, die mit Hilfe des Dicer-Enzyms hergestellt wurden, führten in allen Fällen zum *knock-down*. Die Generierung von esiRNAs mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden erwies sich jedoch als zu Zeit-, Arbeits-, und Kosten-intensiv, um für eine große Anzahl von Genen routinemäßig für Screeningzwecke eingesetzt zu werden. Daher wurden shRNAs als die leichter zu erhaltende Gruppe von *silencing*-Molekülen getestet. Etwas weniger als ein Drittel der im Western-Blot getesteten shRNAs gegen *TP53*, *VIM* und *LMNB1* aus der Expression Arrest™ Human retroviral shRNAmir Bibliothek waren funktionell. Das entspricht in etwa den üblichen Erwartungen. Um die Möglichkeit zu untersuchen, nach anti-apoptotischen Genen, basierend auf reverser Transfektion, zu screenen, wurde *silencing* auf RTZ-Arrays am Beispiel der Gene *TP53* und *LMNB1* etabliert. Zur Bestätigung des Konzepts eines Screenings nach anti-apoptotischen Genen mittels RNAi wurden shRNAs gegen bekannte anti-apoptotische Gene (*BIRC4*, *BIRC5*, *BIRC7* und *DAD1*) getestet. Apoptose wurde nach Nicoletti-Färbung über FACS-Analyse quantifiziert. Durch *silencing* der oben genannten Gene mittels shRNAs in Gegenwart niedriger Konzentrationen der Apoptose-induzierenden Substanz Etoposid konnte eine bis zu 2,8-fach erhöhte Apoptoserate erreicht werden. Aus dem Vergleich dieses Ergebnisses mit den FACS-Ergebnissen der identifizierten pro-apoptotischen Gene lässt sich feststellen, dass die Sensitivität eines Assays basierend auf reverser Transfektion nicht ausreicht, um nach anti-apoptotischen Genen zu screenen. Hierfür müssten sensitivere Methoden entwickelt und verwendet werden, die in der Lage sind, die von apoptotischen Zellen ausgehenden Signale zu verstärken.