

**Identifizierung von Zielgenen des potentiellen  
Transkriptionsfaktors Dpf3/1 in murinen  
Kardiomyozyten**

**Diplomarbeit**

in Biologie



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT



ausgeführt am Max-Planck-Institut  
für molekulare Genetik, Berlin

beantragt am Fachbereich Biologie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Philip Tomann**

August 2006

---

**Für meine Eltern**

## Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Dr. Silke Sperling herzlichen Bedanken für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu können.

Besonderen Dank gilt Frau Dr. Christina Grimm für ihre hervorragende Betreuung.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken, für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Thomas Schmülling von der Angewandten Genetik an der Freien Universität Berlin danke ich für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen.

**Inhaltsverzeichnis**

1	Zielstellung.....	6
2	Einleitung .....	6
2.1	<i>Dpf3</i> .....	8
2.2	Strategien zur Identifizierung potentieller Zielgene von Transkriptionsfaktoren.....	12
2.3	RNA Interferenz (RNAi).....	13
2.3.1	Der zelluläre Mechanismus der RNA Interferenz .....	14
2.3.2	Genanalyse mittels RNA Interferenz .....	17
3	Material & Methoden .....	19
3.1	Chemikalien und Reagenzien .....	19
3.2	Enzyme.....	21
3.3	Geräte und Materialien.....	22
3.4	Oligonukleotide.....	23
3.4.1	siRNA .....	23
3.4.2	Primer.....	24
3.5	Plasmide.....	27
3.6	Lösungen und Medien.....	28
3.6.1	Medien zur Anzucht prokaryotischer Zellen.....	28
3.6.2	Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen.....	29
3.7	Zellbiologische Methoden .....	30
3.7.1	HL-1 Zellen.....	30
3.7.2	Kultivierung von HL-1 Zellen.....	30
3.7.3	Einfrieren von HL-1 Zellen .....	31
3.7.4	Auftauen von HL-1 Zellen .....	31
3.7.5	Geneticin (G418) Dosiskurve von HL-1 Zellen .....	31
3.7.6	C2C12 Zellen .....	31
3.7.7	Kultivierung der C2C12 Zellen .....	32
3.7.8	Einfrieren von C2C12 Zellen.....	32
3.7.9	Auftauen von C2C12 Zellen.....	33
3.7.10	Zellzahlbestimmung mit Neubauer-Zählkammer .....	33
3.7.11	Transfektion von siRNA in Säugetierzellen .....	33
3.7.12	Transfektion von Plasmid in Säugetierzellen.....	34
3.7.13	Mykoplasmentest .....	35
3.8	Molekularbiologische Methoden.....	36
3.8.1	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren .....	36
3.8.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	37
3.8.3	RNA Isolierung aus HL-1 Zellen .....	37
3.8.4	DNase Verdau isolierter RNA .....	38
3.8.5	RNA Aufreinigung mit Eppendorf PLG .....	38
3.8.6	Nukleinsäure-Fällung .....	38
3.8.7	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	39
3.8.8	Reverse Transkriptase .....	40

3.8.9	Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (Real-Time qPCR)	40
3.8.10	Klonierung	42
3.8.11	Transformation von Plasmiden	42
3.8.12	Übernachtkulturen von <i>E.coli</i>	43
3.8.13	Glycerolstocks von <i>E.coli</i>	43
3.8.14	Plasmidaufreinigung aus <i>E.coli</i>	44
3.8.15	Amplifizierung der cDNA-Sequenzen	44
3.8.16	Restriktion	46
3.8.17	Dephosphorylierung von geschnittenen Vektoren	46
3.8.18	Ligation	47
3.8.19	DNA-Sequenzierung	47
4	Ergebnisse	48
4.1	Etablierung der Transfektion von siRNA in HL-1 und C2C12 Zellen	48
4.2	RNAi vermittelter Abbau von Dpf3/1 in HL-1 Zellen	52
4.3	siRNA vermittelte Interferon-Antwort	54
4.4	Auswahl möglicher Zielgene von Dpf3/1	55
4.5	Expression möglicher Zielgene in HL-1 Zellen mit einem RNAi vermittelten Abbau von Dpf3/1	57
4.6	Etablierung der Transfektion von Plasmiden in HL-1 Zellen	59
4.7	G418 Dosiskurve für HL-1 Zellen	60
4.8	Generierung stabiler HL-1 Zellen	61
5	Diskussion	65
5.1	Etablierung der Transfektion von siRNA in HL-1 Zellen	65
5.2	RNAi vermittelter Dpf3/1 Abbau in HL-1 Zellen	66
5.3	Effekte des RNAi vermittelten Abbaus von Dpf3/1 in HL-1 Zellen	68
5.4	Generierung stabiler HL-1 Zellen	70
5.5	Ausblick	70
6	Zusammenfassung	72
	Abkürzungsverzeichnis	74
	Abbildungsverzeichnis	76
	Tabellenverzeichnis	77
	Literaturverzeichnis	78
	Eidesstattliche Erklärung	82

## 1 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es Zielgene des potentiellen Transkriptionsfaktors Dpf3/1 zu identifizieren. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass *Dpf3/1* in entwickelnden Mäuse- und Hühnerherzen exprimiert (Kaynak, 2005) und in Patienten mit angeborenen Herzfehlern verstärkt exprimiert wird (Kaynak *et al.*, 2003). Dies deutet auf eine Rolle von *Dpf3/1* in der Herzentwicklung hin. Zur Analyse der Dpf3/1 Zielgene soll Dpf3/1 in einer murinen Kardiomyozytenlinie mit Hilfe der RNAi-Methode ausgeschaltet, als auch mit konstitutiv exprimierenden Plasmiden verstärkt exprimiert werden. Anschließend soll die Expression möglicher Zielgene mit Hilfe von Real-Time qPCR mit einer Kontrolle verglichen werden.

## 2 Einleitung

In Vertebraten ist das Herz das erste Organ, welches sich entwickelt und eine wichtige Rolle in der Versorgung des Körpers mit Nährstoffen und Sauerstoff übernimmt. Seine Funktion als Pumpe nimmt es in Form eines kontraktile Schlauchs wahr, welcher sich bei Säugern und Vögeln zum vierkammerigen Herzen entwickelt hat. Bei Säugern entwickelt sich das Herz zum größten Teil aus dem primären und sekundären Herzfeld, welche aus mesodermalen Vorläuferzellen bestehen. Das primäre Herzfeld bildet den kardialen Halbmond, welcher zum linearen Herzschlauch fusioniert. Der Herzschlauch dreht sich nach rechts, wobei der posteriore Teil in Richtung des anterioren

Pols wandert. Die Zellen des sekundären Herzfeldes infiltrieren den Herzschlauch und bilden den Ausflusstrakt und große Teile des rechten Ventrikels aus. Die Septierung des Ausflusstrakts wird von Zellen der Neuralleiste unterstützt. Das Epikard wird von Mesothelzellen gebildet, die sich aus der Sinus-venosus-Region über das gesamte Herz ausbreiten (Buckingham *et al.*, 2005, Sadler, 1998). Es bedarf bei diesem Entwicklungsprozess einer genauen zeitlichen und räumlichen Regulation der Expression von spezifischen Genen der Herzentwicklung. Diese Regulation wird über verschiedene Transkriptionsfaktoren erreicht, welche teilweise bekannt sind und deren genaue Funktion und eventuelle Interaktion untereinander Gegenstand der Forschung ist. Die Charakterisierung dieser Transkriptionsfaktoren ist erschwert, weil nur eine Minderheit von angeborenen Herzfehlern (congenital heart diseases / CHDs) aufgrund von einzelnen Gendefekten entstehen, wohingegen die Mehrheit der CHDs durch das Zusammenwirken mehrerer Gendefekte entstehen. Außerdem weisen die durch einzelne Gendefekte hervorgerufenen CHDs verschiedene Phänotypen auf. So können Patienten mit dem Holt-Oram Syndrome, welches durch Mutationen in *TBX5* hervorgerufen wird, einen Atriumseptumdefekt (ASD), Ventrikelseptumdefekt (VSD) oder die Fallot-Tetralogie (*Tetralogy of Fallot / TOF*) aufweisen (Packham *et al.*, 2003); Dies deutet darauf hin, dass die Herzentwicklung durch ein sehr komplexes Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren gesteuert wird, in welchem modifizierende Gene und Umwelteinflüsse eine zusätzliche Rolle spielen.

Dieses Netzwerk ist sehr anfällig und die kleinsten Veränderungen können zu Missbildungen im Herzen führen. Beim Menschen treten diese angeborenen Herzfehler (CHD) in 0,8 % aller Neugeborenen auf und stellen die häufigsten angeborenen Defekte dar. Durch die Charakterisierung bekannter Transkriptionsfaktoren und durch Identifizierung weiterer Gene, welche in der Herzentwicklung eine Rolle spielen, wird weiter zur Aufklärung der Herzentwicklung beigetragen. So wird bei einer genomweiten Analyse von Patienten mit CHDs in Herzproben mit TOF eine erhöhte Expression von *DPF3* gegenüber gesunden Herzen nachgewiesen. (Kaynak *et al.*, 2003). Die TOF stellt mit 10 % die häufigste Art von zyanotischen CHD bei Erwachsenen dar und wurde als erstes vom französischen Pathologen Etienne-Louis Arthur

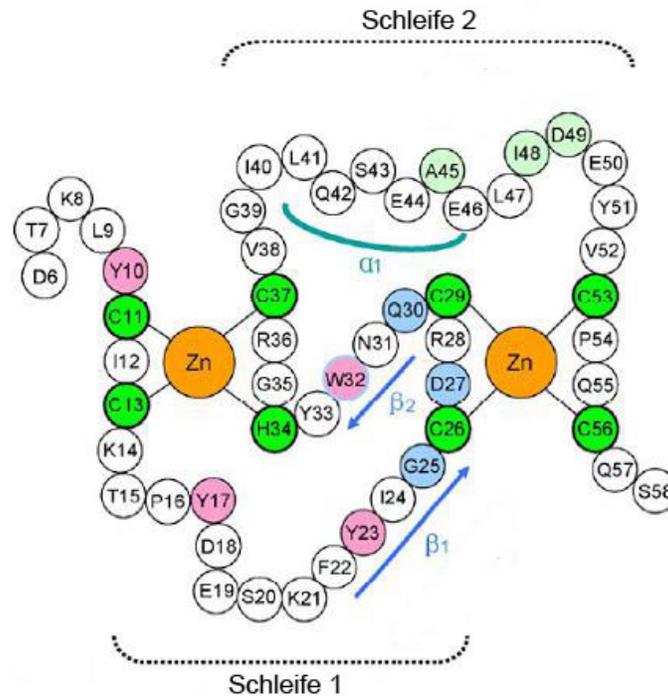
Falot 1988 beschrieben. Vier Merkmale charakterisieren einen TOF: ein ausgeprägter VSD, eine Verengung des Ausflustraktes vom rechten Ventrikel (*right ventricular outflow tract / RVOT*), eine überreitende Aorta und eine Hypertrophie im rechten Ventrikel. Die ersten beiden Abnormitäten verursachen hauptsächlich den Phänotyp. Bei dem VSD handelt es sich meistens um einen perimembranösen VSD mit Verlängerung ins infundibulare Septum. Dabei ist die Größe des VSD ausreichend, um in den beiden Ventrikeln den gleichen Druck einzustellen. Durch diesen überhöhten Druck im rechten Ventrikel reagiert das Herz mit einer sogenannten Hypertrophie, wobei die Zellmasse des rechten Ventrikel durch Vermehrung der kontraktilen Elemente in den Zellen zunimmt. Eine überreitende Aorta beschreibt eine Aorta, deren Öffnung über beiden Ventrikeln lokalisiert ist. Die Verengung des RVOT kann unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Dabei ist in den meisten Fällen zusätzlich noch die Pulmonalklappe missgebildet. Je nach Ausmaß der Verengung kommt es zu einem Links-Rechts-Shunt oder einem Rechts-Links-Shunt. Bei einer stark ausgeprägten Verengung des RVOT steigt der Druck im rechten Ventrikel so stark, dass das sauerstoffarme Blut unter Umgehung des Lungenkreislaufs direkt ins linke Ventrikel gelangt (Rechts-Links-Shunt). Durch diese Vermischung des sauerstoffarmen Bluts mit dem sauerstoffreichen Blut, wird ein Blaufärbung von Haut und Schleimhäuten, hauptsächlich an den Händen und Füßen hervorgerufen. Beim Auftreten dieses Phänomen spricht man von einer Zyanose (Park, 1997).

## **2.1 Dpf3**

*Dpf3* (D4, zinc and double PHD fingers, family 3) gehört der d4 Genfamilie an, welche aus strukturell ähnlichen und evolutionär konservierten kernlokalisierten Proteinen besteht. Die d4 Genfamilie ist von Vertebraten zu Invertebraten konserviert, welches auf eine allgemein wichtige Funktion schließen lässt (Chestkov *et al.*, 1996). Es wird vermutet, dass die einzelnen Vertreter als Transkriptionsfaktoren fungieren und verschiedene intrazelluläre

Prozesse regulieren. Ihnen wird eine Rolle in der Differenzierung von Zellen und in der Regulation der Apoptose zugesprochen, wobei die genaue biologische Funktion ungeklärt ist.

Vertreter der d4-Genfamilie weisen alle die gleichen charakteristischen Domänen auf (siehe Abbildung 2). Im N-terminalen Bereich befindet sich die sogenannte 2/3-Domäne, welche meist ein Kernlokalisierungssignal (NLS) beinhaltet. In Transaktivierungsassays wurde gezeigt, dass die 2/3-Domäne von Dpf3 eine reprimierende Wirkung besitzt (Grimm *et al.*, unveröffentlicht), aber die genaue Funktion ist weitgehend unbekannt. Im mittleren Bereich befindet sich ein C2H2 Zinkfinger, welcher eine DNA-Bindedomäne darstellt. Im Allgemeinen bestehen C2H2-Zinkfinger aus 25 bis 30 Aminosäuren in denen sich zwei konservierte Cysteine und zwei konservierte Histidine befinden, wobei die Anordnung folgendem Motiv folgt C-2-C-12-H-3-H (EMBL-EBI, August 2006). Die vier konservierten Aminosäuren binden, unter Ausbildung einer schleifenförmigen Tertiärstruktur, ein Zinkion. Die ausgebildete Schleife formt eine Art Finger, welcher sich in die große Rinne der DNA legen kann und dort Interaktionen mit den Nukleotiden eingeht. Die 12 Aminosäuren, welche die Schleife ausbilden, sind meistens polar und basisch. Im C-terminalen Bereich des Proteins befinden sich nebeneinander zwei PHD-Finger (plant homeodomain). Die PHD wurde als erstes in einem Pflanzenprotein beschrieben (Schindler *et al.*, 1993) und später als echte Proteindomäne, welche in vielen eukaryotischen Proteinen vorkommt, verifiziert (Aasland *et al.*, 1995). Sie ist charakterisiert durch ein Cystein<sub>4</sub>-Histidin-Cystein<sub>3</sub> Motiv, welches zwei Zinkionen bindet, wodurch zwei Schleifen ausgebildet werden (siehe Abbildung 1). Am nächsten verwandt ist sie mit der sog. RING Domäne, welche in vielen Fällen Proteininteraktionen mit der E2 Ligase eingeht. PHD-Finger sind ausschließlich in kernlokalisierten Proteinen zu finden, welche als Liganden Proteine und Nucleosomen besitzen (Bienz, 2006). Es wird daher angenommen, dass Proteine mit einem PHD-Finger die Transkription über Chromatinmodulation regulieren (Aasland *et al.*, 1995).

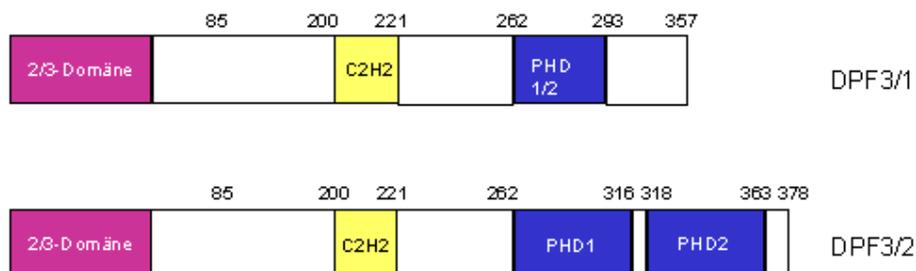


**Abbildung 1: PHD-Finger von BPTF.** Die Aminosäuren des konservierten Cystein<sub>4</sub>-Histidin-Cystein<sub>3</sub> Motivs sind grün unterlegt und die Aminosäuren zur Ausbildung des aromatische Käfigs sind violettrot unterlegt. Die blau und hellgrün unterlegten Aminosäuren dienen zur Bindung vom Histone 3.  $\alpha$  zeigt eine  $\alpha$ -Helix und  $\beta$  eine  $\beta$ -Faltblattstruktur an. (Modifiziert nach Li *et al.*, 2006)

In zwei kürzlich veröffentlichten Arbeiten wurde gezeigt, dass der PHD-Finger von Mitgliedern der ING-Familie (*inhibitor of growth*) und von BPTF (*bromodomain and PHD domain transcription factor*) eine Untereinheit von NURF (*nucleosome remodelling factor*) spezifisch an trimethyliertes Lysin 4 vom Histone 3 (H3K4me<sub>3</sub>) bindet (Shi *et al.*, 2006, Wysocka *et al.*, 2006). Die Bindung von K4me<sub>3</sub> an den PHD-Finger erfolgt über einen aromatischen Käfig, durch Wechselwirkung zwischen der  $\pi$ -Wolke der Aromaten und der Methylgruppen vom Lysin 4. Die im PHD-Finger befindlichen aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan bilden den aromatischen Käfig aus. Die Spezifität für H3K4me<sub>3</sub> wird über die unique Umgebung von Lysin 4 im Histone 3 erreicht (siehe Abbildung 1). Dabei werden Wasserstoffbrücken und komplementäre Oberflächeninteraktionen zwischen dem PHD-Finger und dem N-terminalen Schwanz vom Histone 3 eingegangen (Pena *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2006). Die für diese Interaktionen benötigten Aminosäuren befinden sich nur in einer Untermenge von Proteinen mit einem PHD-Finger, weshalb

vermutlich nur ein Teil von Proteinen mit PHD-Finger an H3K4me3 binden kann (Pena *et al.*, 2006).

Bei Säugern sind bisher drei Vertreter der d4 Genfamilie bekannt *neuro-d4*, *ubi-d4/Requiem* und *cer-d4/Dpf3*. *Neuro-d4* wurde als neurospezifisches Entwicklungsgen in der Ratte charakterisiert, dessen Expression auf neuronales Gewebe beschränkt ist und alternative Spleißformen aufweist (Buchman *et al.*, 1992). Das zweite Mitglied der Familie, *Requiem*, wird ubiquitär in murinen Gewebe exprimiert, besitzt keine Isoformen und spielt eine Rolle in der Apoptose (Gabig *et al.*, 1994). *Dpf3* wurde bei einer Durchsuchung einer menschlichen Cosmidbibliothek mit einer *neuro-d4* cDNA aus der Ratte identifiziert (Chestkov *et al.*, 1996). Die Struktur und die Expressionsprofile der beiden Hauptisoformen wurden später in der Maus und im Huhn beschrieben (Ninkina *et al.*, 2001, Kaynak, 2005). Die Domänenorganisation der beiden beschriebenen Spleißformen von Dpf3 weichen im C-Terminus leicht voneinander ab. Im N-terminalen Bereich besitzen beide die 2/3 Domäne und im mittleren Teil des Proteins den C2H2 Zinkfinger. Die im C-Terminus tandemartig angeordneten PHD-Finger besitzt nur Dpf3/2, wohingegen Dpf3/1 nur einen halben PHD-Finger besitzt (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Proteinstruktur von Dpf3/1 und Dpf3/2.** C2H2 steht für ein C2H2-Zinkfinger und PHD für einen PHD-Finger.

Die Expression von *Dpf3* wird während der Embryogenese von Maus und Huhn im Kleinhirn und in der Netzhaut nachgewiesen (Ninkina *et al.*, 2001). Des Weiteren wird die Expression von *Dpf3/1* im Ventrikel, im Artrium und im Einfluss- und Ausflusstrakt des Herzens von Mäuse- und Hühnerembryonen

nachgewiesen (Kaynak, 2005). Dies läßt auf eine mögliche Funktion von *Dpf3/1* in der Herzentwicklung schließen.

## **2.2 Strategien zur Identifizierung potentieller Zielgene von Transkriptionsfaktoren**

Die Schwierigkeit in der Identifizierung möglicher Zielgene von Transkriptionsfaktoren ist sie aus der Vielzahl von Genen herauszufiltern. Falls noch keinerlei Vorkenntnisse über mögliche Zielgene eines Transkriptionsfaktors existieren, bedarf es einer Methode, welche schnell und unter Einsatz von wenig Material sehr viele Gene testet. Mit Hilfe eines DNA-Microarray können zur gleichen Zeit sehr viele Gene auf ihr Expressionsprofil hin untersucht werden. Auf einem Array werden im Idealfall von allen Genen eines Organismus unique Abschnitte fixiert. Des Weiteren werden zwei zu vergleichende cDNA Proben erstellt, welche mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind. Anschließend werden die beiden cDNA Proben mit dem Array hybridisiert und die Überlagerung der beiden Farbsignale gibt Auskunft über mögliche differenzielle Expression zwischen den beiden Proben. Zur Identifizierung von möglichen Zielgenen könnte man die cDNA von Organismen, in welchen der zu untersuchende Transkriptionsfaktor ausgeschaltet oder überexprimiert ist, mit einer cDNA vom Wildtyp vergleichen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, ein sogenanntes „ChIP on Chip“ Experiment durchzuführen. Dabei wird durch Chromatin Immunopräzipitation mit einem für den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor spezifischen Antikörper, diejenigen DNA-Abschnitte angereichert, an welche der Transkriptionsfaktor bindet. Durch Hybridisierung dieser Probe auf einen Array können Bindestellen des Transkriptionsfaktors im Genom identifiziert werden. Diese beiden Methoden filtern sehr schnell aus der Masse an Genen potentielle Zielgene heraus. Allerdings bedarf es weiterer Untersuchungen zur Verifizierung der potentiellen Zielgene. Eine

Möglichkeit zur weiterführenden Untersuchung wäre, in Zellkultur den gewünschten Transkriptionsfaktor mittels der RNAi-Methode auszuschalten oder die Expression mit Hilfe von konstitutiv exprimierenden Plasmiden zu verstärken. Anschließend kann mit Hilfe von Real-Time qPCR die Expression der möglichen Zielgene mit einer Kontrolle verglichen werden. Des Weiteren kann man einen sogenannten EMSA (electrophoretic mobility shift assay) machen, bei welchem die Wanderungsgeschwindigkeit eines markierten DNA-Fragments in Gegenwart und Abwesenheit des Transkriptionsfaktors bestimmt wird. Durch Bindung des Transkriptionsfaktors an das DNA-Fragment würde sich die Wandergeschwindigkeit verringern. Eine dritte Möglichkeit stellen Reporterassays dar, wobei hinter dem Promotor eines potentiellen Zielgens ein Reporter gen steht, dessen Aktivität man in Gegenwart und Abwesenheit des Transkriptionsfaktor bestimmt. Mit Hilfe dieser Methoden ist es möglich, aus der Vielzahl von Genen potentielle Zielgene herauszufiltern.

### **2.3 RNA Interferenz (RNAi)**

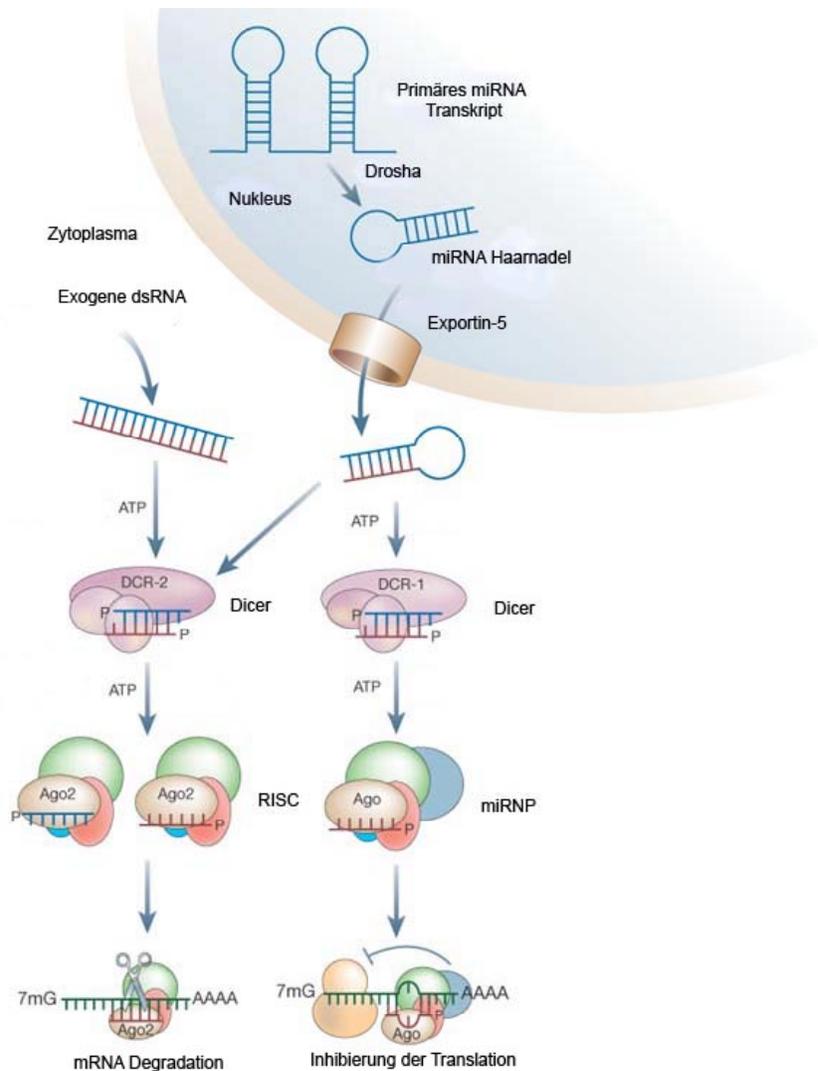
Der Begriff der RNA Interferenz (RNAi) beschreibt die durch Doppelstrang RNA (dsRNA) induzierte sequenzspezifische posttranskriptionale Inaktivierung eines Genes. Diese Beschreibung der RNAi als biologische Antwort auf dsRNA entstand nach Experimenten mit dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1991, Guo *et al.*, 1995). Weiterführende Experimente zeigten, dass die Injektion von dsRNA in *C. elegans* in den Abbau der komplementären mRNA resultiert (Fire *et al.*, 1998). Dieser in fast allen Eukaryoten konservierte Mechanismus (Hannon, 2002) konnte zuerst nicht in Säugetierzellen nachgewiesen werden. Durch Injektion von dsRNA in Säugetierzellen wird eine angeborene Immunantwort, einschließlich einer Interferon regulierten Antwort zur Virusabwehr, hervorgerufen. Das Enzym dsRNA-abhängige Proteinkinase (Pkr) wird durch dsRNA Bindung aktiviert und führt zur unspezifischen Degradation von mRNA und Inhibierung der

Proteinsynthese (Williams, 1997, Sledz *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Antwort von Säugetierzellen gegenüber dsRNA erschien ein Versuch, spezifisch eine mRNA zu degradieren als nicht möglich. Erst die Erkenntnis, dass kleinere dsRNA Fragmente (siRNA), welche eine Größe von etwa 21 Basenpaaren (Bp) haben, die Effektoren des RNAi Mechanismus darstellen (Elbashir *et al.*, 2001), führte zur einer Lösung. Die Transfektion von siRNA in Säugetierzellen resultierte in einer spezifischen Degradation der mRNA ohne eine Interferonantwort hervorzurufen (Elbashir *et al.*, 2001b, Caplen *et al.*, 2001).

### 2.3.1 Der zelluläre Mechanismus der RNA Interferenz

Der zelluläre Mechanismus der RNAi beginnt mit der Bildung funktioneller siRNAs durch Zerkleinerung von dsRNA mit Hilfe des Dicer-Enzyms. Das Dicer-Enzym ist ein ca. 220 kDa großes, evolutionär konserviertes Mitglied der RNaseIII-Familie (Zhang *et al.*, 2002). Es besteht aus einer Helikase/ATPase-Domäne, einer PAZ-Domäne für Protein-Protein-Interaktionen, einem dsRNA-bindenden Motiv und zwei RNaseIII-katalytische Seiten (Denli *et al.*, 2003) Die Helikase/ATPase-Domäne wird vermutlich benötigt, um eine Wanderung des Enzyms entlang der dsRNA zu ermöglichen, oder eine strukturelle Änderung am Substrat zur besseren Zugänglichkeit zu erzeugen (Zhang *et al.*, 2002). Dieser Prozess ist ATP-abhängig, hingegen wurde beim humanen Dicer keine ATP-Abhängigkeit beobachtet (Meister *et al.*, 2004). Der Grund für diesen Unterschied in der ATP-Abhängigkeit ist ungeklärt. Im Dicer wird die dsRNA durch die katalytische RNaseIII-Domäne in 21 Bp große dsRNA mit einer 5'-Phosphatgruppe und einem 2-nt-langen 3'-Überhang zerkleinert (Elbashir *et al.*, 2001). Anschließend bilden die siRNAs mit einem Proteinkomplex den so genannten „*RNA induced silencing complex*“ (RISC). Dabei wird ein Strang der siRNA in den RISC eingebaut. Der Aufbau des RISC ist ATP-abhängig, was vermutlich die Notwendigkeit der Entspannung des siRNA-Duplex und mögliche Konformationsänderung widerspiegelt. Die Zusammensetzung der siRNA entscheidet über die Präferenz, ob der kodierende oder nicht

kodierende Strang des siRNA-Duplex in den RISC eingebaut wird (Meister *et al.*, 2004). Grundsätzlich lässt sich sagen, dass der Strang mit der geringeren Thermostabilität am 5'-Ende effektiver eingebaut wird (Aronin, 2006). Der RISC mit eingebautem nicht kodierenden Strang bindet an die komplementäre mRNA und inhibiert deren Translation durch Degradation oder Blockade der Translationsmaschinerie.



**Abbildung 3: Modell der RNA Interferenz.** Primäre miRNA wird durch Drosch prozessiert und über Exportin-5 ins Zytoplasma transportiert. Dort wird es von Dicer in siRNA prozessiert und in miRNP/RISC eingebaut. Anschließend inhibiert oder spaltet sie die Ziel-mRNA. Exogene dsRNA wird durch Dicer in siRNA prozessiert, in RISC eingebaut und verursacht die Spaltung der Ziel-mRNA. (Modifiziert nach Meister *et al.*, 2004)

Im Proteinkomplex ist immer ein Mitglied der Argonaute (Ago) Proteinfamilie enthalten. Ago Proteine haben ein Molekulargewicht von ungefähr 100 kDa

und beinhalten zwei konservierte Domänen: PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) und PIWI. Die PIWI-Domäne weist Ähnlichkeit mit Mitgliedern der RNase H Familie auf und es wird vermutet, dass sie die Ziel-mRNA im mRNA/siRNA-Hybrid spaltet (Meister *et al.*, 2004). Die PAZ-Domäne ist vermutlich für die spezifische Erkennung und Bindung der siRNAs mit ihrem 21 Bp sowie 2-nt-lange 3'-Überhänge und 5'-phosphorylierte Enden zuständig (Meister *et al.*, 2004) (siehe Abbildung 3).

In Eukaryoten dient dieser Mechanismus zur Erhaltung der Stabilität des Genoms, stellt einen Abwehrmechanismus gegenüber Viren dar und dient der Genregulation (Zamore, 2001, Meister *et al.*, 2004). Aufgrund ihrer Herkunft oder Funktion können drei kleine dsRNA unterschieden werden: „*short interfering RNAs*“ (siRNA), „*repeat-associated short interfering RNAs*“ (rasiRNA) und „*microRNAs*“ (miRNA). Die Prozessierung dieser kleinen dsRNAs verlaufen grundsätzlich nach dem oben beschriebenen Mechanismus mit minimalen Abweichungen.

Exogen in die Zellen eingeführte dsRNA wird mit Hilfe des Dicer-Enzyms in siRNA prozessiert. Natürliche Quellen für diese dsRNA stellen RNA-Viren dar. Die entstehende siRNA bildet zusammen mit einem Proteinkomplex den RISC. Der RISC bindet komplementär an die Ziel-mRNA und verursacht die Spaltung der mRNA in der Mitte der komplementären Region (10 Basen vom 5'-Ende der siRNA) und führt zur Degradation der mRNA (Elbashir *et al.*, 2001) (siehe Abbildung 3). Dadurch wird die Expression artfremder Gene in Eukaryoten gehemmt und stellt somit einen Mechanismus der Virusabwehr dar (Waterhouse *et al.*, 2001).

Die Vorläufer der rasiRNAs entstehen in der Natur durch Hybridisierung von überlappenden Transkripten (z.B. von repetitiven Sequenzen oder Transposons), welche anschließend über den beschriebenen Mechanismus mit dem Dicer-Proteinkomplex in rasiRNA zerkleinert werden. Zusammen mit einem weiteren Proteinkomplex bildet die rasiRNA den „*RNA induced transcriptional gene silencing*“-Komplex (RITS). Im Proteinkomplex befinden sich unter anderem ein Mitglied der Argonaute-Proteinfamilie und ein Protein mit einer Chromodomäne. Der RITS-Komplex bindet an Chromatin und führt zur Rekrutierung weiterer Proteine, welche zur Bildung von Heterochromatin beitragen und somit zur Geninaktivierung auf der Ebene der Transkription

(Lippman *et al.*, 2004). Über diesen Mechanismus wird die Mobilität von Transposons unterdrückt und eine Anreicherung von repetitiven Sequenzen verhindert, wodurch die Stabilität des Genoms gewährleistet wird (Zamore, 2001).

Die miRNAs sind eine Klasse von kleinen endogenen RNAs, welche die Translation der komplementären mRNA steuern (Ambros, 2004). Die miRNAs werden im Nukleus transkribiert und bilden als Sekundärstruktur aufeinanderfolgende Haarnadeln aus. Dieses Primärtranskript wird im Nukleus durch den Proteinkomplex Drosha, welcher eine dsRNA spezifischen RNase-III-Typ Endonuklease ist, in einzelne Haarnadeln mit einer 5'-Phosphatgruppe und einem 2-nt-langen 3'Überhang geteilt (Meister *et al.*, 2004). Anschließend wird die miRNA über Exportin-5 ins Zytoplasma transportiert, um dort weiter mit Dicer prozessiert zu werden. Es gibt zwei verschiedene Modi der Wirkungsweise von miRNAs. Entweder sie werden durch den Mechanismus vom siRNA-Weg in den RISC eingebaut und vollziehen ihre Funktion durch Degradation der Ziel-mRNA. Dieser Mechanismus wird hauptsächlich von Pflanzen ausgeführt. Im anderem Modus bilden die miRNAs mit einem Ago-Protein enthaltenem Proteinkomplex einen so genannten „*miRNA-containing ribonucleoprotein particle*“ (miRNP). Dieser bindet unter Ausbildung von Fehlpaarungen an die komplementäre mRNA und inhibiert die Translation der mRNA (siehe Abbildung 3). Es wird vermutet, dass durch die Fehlpaarungen eine reduzierte Spaltungsaffinität der Ziel-mRNA besteht und dadurch der Komplex stabil bleibt (Meister *et al.*, 2004).

### **2.3.2 Genanalyse mittels RNA Interferenz**

Die RNAi-Methode stellt eine sehr leistungsfähige Methode zur funktionellen Genanalyse dar. Die Vorteile gegenüber konventionellen Methoden sind vor allem ihre leichte Anwendbarkeit, schnelle Durchführung und hohe Spezifität. Bei ihrer Anwendung ist darauf zu achten eine siRNA zu benutzen, welche die höchste Wahrscheinlichkeit hat, einen effektiven und spezifischen RISC

auszubilden (Huppi *et al.*, 2005). Beim Design der siRNA sollte auf eine sehr hohe Sequenzspezifität zur Ziel-mRNA und auf eine hohe Wahrscheinlichkeit zum Einbau des nicht kodierenden Strangs in den RISC geachtet werden. Die hohe Sequenzspezifität ist wichtig, um die Degradation von nicht spezifischen mRNAs zu vermeiden. Es wurde gezeigt, dass nicht spezifische mRNAs mit nur 11 aufeinanderfolgenden Basenpaarungen zur siRNA degradiert werden (Jackson *et al.*, 2003). Des Weiteren werden durch den wahrscheinlicheren Einbau des nicht kodierenden Strangs, mögliche Interaktion zwischen kodierendem Strang und unspezifischen mRNAs verhindert. In den RISC wird bevorzugt der Strang mit dem instabileren 5'-Ende eingebaut und außerdem beeinflussen bestimmte Nukleotidkombinationen die Präferenz für einen bestimmten Strang (Huppi *et al.*, 2005). Durch Degradation von nicht spezifischen mRNAs wird die Auswertung der erhaltenen Daten erschwert. In Zellkultur sollte die eingesetzte siRNA-Konzentration minimiert werden. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit, nicht spezifische mRNAs zu degradieren und in Säugetierzellen die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Immunantwort gegenüber dsRNA herabgesetzt (Huppi *et al.*, 2005).

Bei einem RNAi-Experiment mit siRNA sollten verschiedene siRNAs für eine mRNA eingesetzt werden und die Effizienz der einzelnen siRNAs auf der RNA- und auf der Proteinebene nachgewiesen werden. Zum Design der verwendeten siRNAs können verschiedene Softwareprogramme benutzt werden, z.B. der BLOCK-IT RNAi Designer, welcher den Stealth-Algorithmus verwendet. Die „Stealth“ RNAi Technologie umfasst synthetische RNAi Moleküle, die durch chemische Modifikationen besser sein sollen als konventionelle siRNAs. Die modifizierten dsRNA Moleküle sollten nicht von den Komplexen erkannt werden, welche die Interferon vermittelte Immunantwort in Zellen initiieren. Gleichzeitig sollen sie stabiler sein und eine effektivere Herunterregulation des Zielproteins bewirken, indem nur der nicht kodierende Strang in den RISC inkorporiert wird (Edenson, 2004). Dadurch sollen Artefakte und Schwierigkeiten bei der Interpretation der erzielten Ergebnisse reduziert werden.

### 3 Material & Methoden

#### 3.1 Chemikalien und Reagenzien

1 KBp DNA Ladder	New England Biolabs Frankfurt a.M.; # N3232S
100 Bp DNA Ladder	New England Biolabs Frankfurt a.M.; # N3231S
Agarose Electrophoresis Grade	Invitrogen, Karlsruhe; # 15510
BACTO Agar	Beckton Dickinson, Le Pont de Claix; # 214010
BACTO Yeast Extract, Difco	Beckton Dickinson, Le Pont de Claix; # 212750
BLOCK-IT FITC	Invitrogen, Karlsruhe; #2013
Claycomb Medium	JRH Bioscience, Lenexa; # 51800
Endofree Plasmid Purification Kit Maxi	Qiagen, Hilden; # 12362
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen; # P8779
Destilliertes, steriles, Zellkultur getestetes Wasser	Gibco, Karlsruhe; # 15230-089
DEPC-behandeltes H <sub>2</sub> O	Invitrogen, Karlsruhe; # 750024
DTT	Promega, Mannheim; # P1171
Dulbecco's Modified Eagles-Medium (DMEM)	Gibco, Karlsruhe; # 31885

Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen; # D-8537
Ethidiumbromid Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen; # E-1510
FBS	JRH Bioscience, Lenexa; # 12103
Geneticin (G418)	Gibco, Karlsruhe; # 10131
GeneSilencer	PEQLab, Erlangen; #13-T500
L-Ascorbinsäure, Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen; # A-7631
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe; # 25030
Lipofectamine2000	Invitrogen, Karlsruhe; #11668
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt; # K31597904
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt; # B884098
Norepinephrin (+)-bitartrate salt	Sigma-Aldrich, Taufkirchen; # A-0937
Perfectprep Plasmid Kit	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf; # 0032005.500 # 0032005.551
Mini	
Midi	
PLUS Reagent	Invitrogen, Karlsruhe; #11514
Rnase Away	Roth, Karlsruhe; # A998.1
Stealth RNAi Negative Control Low GC	Invitrogen, Karlsruhe; #12935200
Stealth siRNA	Invitrogen, Karlsruhe;
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe; # 15596
Trypan Blue solution 0,4 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen; # T8154
Trypsin Soybean Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe; # 17075
Trypton Peptone, Difco	Beckton Dickinson, Le Pont de Claix; # 211705
Venor GeM Mykoplasmen Detektions Kit	Minerva Biolabs, Berlin; #11-1025

---

Wasser für die Chromatographie	Merck KGaA, Darmstadt; #115333
Wizard SV-Gel and PCR clean up system	Promega, Mannheim; # A9281
X-tremeGENE	Roche Applied Science, Mannheim; # 04476093001

### 3.2 Enzyme

AMV-Reverse-Transkriptase (AMV-RT)	Promega, Mannheim; # M5108
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt a.M.; M0289;
DNase (RNase frei)	Promega, Mannheim; # M6101
Hotstar Taq	Qiagen, Hilden; # 203205
Platinum Pfx DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe; # 11708
Restriktionsenzyme:	New England Biolabs, Frankfurt a.M.;
BspHI	# R0517
EcoRI	# R0101
NheI	# R0131
NotI	# R0189
Sall	# R0138
RNasin Ribonuclease inhibitor	Promega, Mannheim; # N2115
Sybr Green	ABgene, Hamburg; # 4309155
T4 DNA Ligase	Promega, Mannheim; # M1801
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe; # 25300

### 3.3 Geräte und Materialien

384 well clear optical reaction	Applied Biosystems, Foster City; # 4309849
96 well clear optical reaction	Applied Biosystems, Foster City; # 4314320
7900 HT Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City; # 4329001
Brutschrank, Heraeus Function Line	Heraeus Instruments, Hanau
CO <sub>2</sub> -Begasungsbrutschrank Hera cell	Heraeus Instruments, Hanau;
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene Labware, Hereford; # 5100
Eppendorf centrifuge	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf;
5180R	# 5810 000
5415D	# 5425 000
Gel Doc 2000	Bio-Rad, München;
Inkubationsschüttler, Model G25	New Brunswick Scientific, Edison;
MJ Research PTC-225	Biozym, Oldendorf;
PLG Heavy, 1,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf; # 0032007.953
Primer-Express V2.0	Applied Biosystems, Foster City;
Sequence Detection System 2.1	Applied Biosystems, Foster City;
Serologische Pipetten	Nunc, Wiesbaden;
2 ml	# 159617
5 ml	# 159625
10 ml	# 159633
25 ml	# 159641

Sterile Sicherheitswerkbank, Hera safe	Heraeus Instruments, Hanau;
Syringe filters 0,2 µm	Gelman, Pall Corp., Ann Arbor; # 4192
T-75 Zellkulturflasche	Biochrom, Berlin; # P90750
Zellkultur-Testplatten	Biochrom, Berlin
6-Wells	# P92406
12-Wells	# P92412
24-Wells	# P92424
Zellschaber	Biochrom, Berlin; # P99020

### 3.4 Oligonukleotide

#### 3.4.1 siRNA

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten siRNAs gegen *Dpf3/1*.

Gen	siRNA	Sequenzen 5´-3´
<i>Dpf3/1</i>	AF362750_Stealth_962	CCUCAACUUUCUACGGCUUUGAUGA
<i>Dpf3/1</i>	AF362750_Stealth_1115	UGACUCUGGUCAUUGUUCUAGUUCU

Die Sequenzen der Negativ Kontrolle (Stealth RNAi Negative Control Low GC) und des mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markiertem RNA-Oligo (BLOCK-IT FITC) wurden vom Hersteller nicht veröffentlicht. Beide Sequenzen besitzen im Mausgenom keine komplementären Sequenzen und sind unterschiedlich groß. Die Sequenz der Negativ Kontrolle besitzt einen GC-Gehalt, welcher den der beiden siRNAs gegen *Dpf3/1* entspricht. Die beiden Stealth siRNAs gegen *Dpf3/1* wurden mit Hilfe des BLOCK IT RNAi Designer von Invitrogen erstellt.

### 3.4.2 Primer

Die Primer wurden mit Hilfe des Programms „Primer-Express“ von Applied Biosystems Version 2.0 designt. Dabei wurden folgende Parameter zu Grunde gelegt. Die Primer sollten eine Länge von 18 bis 22 Basen und einen GC-Gehalt zwischen 40 und 60 % besitzen. Die Annealing-Temperatur lag bei allen Primer bei 55 °C. Bei der Primerauswahl wurde darauf geachtet die Wahrscheinlichkeit von der Ausbildung von Primerdimer und Haarnadelstrukturen gering zu halten. Die erhaltenen Primer wurden zuerst in einer PCR auf ihre Funktionalität getestet und anschließend eine Verdünnungsreihe zum Test der Effizienz vollzogen. Dabei wurde eine Dissoziationskurve erstellt, um eventuell auftretende Primerdimer zu detektieren.

Alle verwendeten Primer wurden bei Invitrogen bestellt.

#### Real-Time Primer:

**Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Real-Time-qPCR Primer.**

Gen	Primername	Sequenzen 5´-3´
<i>1810007M14Rik</i>	1810007M14Rik_m_f4	AAGGAATTAACATCCCTCAGG
	1810007M14Rik_m_r4	ACCGTAAGGCATTGTCTGGTA
<i>Abl1</i>	Abl1_m_f1	ATCAAGTCGGACGTGTGGG
	Abl1_m_r1	CGGGTAAGGTGACATGCCA
<i>Acta1</i>	Acta1_rt_m_f	TTGTGTGTGACAACGGCTCTG
	Acta1_rt_m_r	ACCCACGTAGGAGTCCTTCTGA
<i>Adam9</i>	Adam9_f1	AAGAAGTGTGCCACTGGGAAC
	Adam9_r1	CATGTCCTGTACATTCTCGCAT
<i>Bmp4</i>	Bmp4_rt_m_f	CGACGGAACACTGTGAGGAGTT
	Bmp4_rt_m_r	GGATGCTGCTGAGGTTGAAGAG
<i>B2m</i>	B2m_m_f3	CGGCCTGTATGCTATCCAGAA
	B2m_m_r3	CAGTTCAGTATGTTCCGGCTTCC

<i>CamK2b</i>	CamK2b_rt_m_f	GCCTCCATGACAGCATCTCTGA
	CamK2b_rt_m_r	CAGGATCTGCTGGATGCAGTGA
<i>Capn2</i>	Capn2_f1	CTGCTTGGCTGCTCTATCGAT
	Capn2_r1	TGGTACGTAACGGCCTCAGAA
<i>Cycs</i>	Cycs_m_f1	ACCAGCCCGGAACGAATTA
	Cycs_m_r1	TTTGGTCCAGTCTTATGCTTGC
<i>Dpf3</i>	H1_m_e3-4_f2	AAGAAGCGACGATTGCACC
	H1_m_e3-4_r2	AGCAAGGCTTCCAGTGTGGTAC
<i>Dpf3/1-1</i>	H1_m_cg_f10	CTTGCCTTTTCTTCTGCCTC
	H1_m_cg_r10	GTCCTGCTCTTCCCTGGTTCT
<i>Dpf3/1-2</i>	H1_mE9_f2	CGGTTCCACGTCAGAAAGTG
	H1_mE9_r2	CTGTCCCATGTGCTCAGCAG
<i>Dpf3/1-3</i>	H1_m_R4_f3	GACAGACTGTGTGGCCAATTA
	H1_m_R4_r3	GGATTAAGGGAAATGCCCAAG
<i>Dpf3/2</i>	H1_m_R9_f2	CCTCATTTCTACCAGCGGGA
	H1_m_R9_r2	GCAACACACGAGTGGTTGATG
<i>Efnb2</i>	Efnb2_f1	CGTCCAGAGCTAGAAGCTGGTA
	Efnb2_r1	ACTTCGGAACCCAGGAGATT
<i>Emp1</i>	Emp1_f1	TCCTACGGCAATGAAGATGCTA
	Emp1_r1	GAGGATCATGAAGGCTTGCACT
<i>Gata4</i>	Gata4_rt_m_f	CACAAGATGAACGGCATCAAC
	Gata4_rt_m_r	TACATACAGGCTCACCCCTCGG
<i>Hprt</i>	Hprt_m_f	AAACAATGCAAACCTTTGCTTTCC
	Hprt_m_r	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
<i>Irf1</i>	Irf1_m_f1	ACCATGCCAATCACTCGAATGC
	Irf1_m_r1	TTGATGTCCCAGCCGTGCTTA
<i>Lmna</i>	Lmna_m_f1	CGCAACAAGTCCAACGAGG
	Lmna_m_r1	TGGGAAGCGATAGGTCATCA
<i>Morf4l2</i>	Morf4l2_f1	AGAAGGAACATTGTTGGTTGGA
	Morf4l2_r1	GCATATTGCTTCGAGTTGGTTT
<i>Myl1</i>	Myl1_rt_m_f	CCAATGCAGAGGTCAAGAAGG
	Myl1_rt_m_r	TGGAGATAGCTTGCATCATGG

<i>Nkx2-5</i>	<i>Nkx2.5_rt_m_f</i>	ACCTTTCTCCGATCCATCCCA
	<i>Nkx2.5_rt_m_r</i>	CCTAGTGTGGAATCCGTCGAA
<i>Nppa</i>	<i>Nppa_m_f1</i>	CTTCTTCCTCGTCTTGGCCTT
	<i>Nppa_m_r1</i>	TCCAGGTGGTCTAGCAGGTTCT
<i>Nr2f1</i>	<i>Coup-TF1_rt_m_f</i>	TTACACATGCCGTGCCAACAG
	<i>Coup-TF1_rt_m_r</i>	AGGCATTCTTCCTCGCTGAACC
<i>Pknox1</i>	<i>Pknox1_m_f1</i>	ATGGCGACACAGACGCTAAGT
	<i>Pknox1_m_r1</i>	TGCCTATAAATGGCCTGCTTG
<i>Pkr</i>	<i>Pkr_m_f1</i>	TGCACGGAGTAGCCATTACGT
	<i>Pkr_m_r1</i>	TGCCTCCTGCTTTGATCTACCT
<i>Rxra</i>	<i>Rxra_rt_m_f</i>	CAAGGACTGCCTGATCGACAA
	<i>Rxra_rt_m_r</i>	TGGACTCCACCTCGTTCTCAT
<i>Sdh-a</i>	<i>Sdh-a_m_rt_f1</i>	TTGTTCAAGTTCCACCCACAG
	<i>Sdh-a_m_rt_r1</i>	CAGGTGCGTATCTCTCCATGA
<i>Smad3</i>	<i>Smad3_m_f</i>	AACTTCCCTGCTGGCATTGAG
	<i>Smad3_m_r</i>	CCATGCTGTGGTTCATCTGGT
<i>Tank</i>	<i>Tank_f1</i>	TGACCCTTGATGAACCACATGA
	<i>Tank_r1</i>	AGACCCTTGGCGGATTCTTT
<i>Tbp</i>	<i>Tbp_m_f1</i>	TGCCACACCAGCTTCTGAGA
	<i>Tbp_m_r1</i>	GATGACTGCAGCAAATCGCTT
<i>Tnni1</i>	<i>Tnni1_rt_m_f</i>	GCTCTAAGCACAAGGTGTCCAT
	<i>Tnni1_rt_m_r</i>	TTCTCCAGTCTCCTACCTCGA
<i>Tnni3</i>	<i>Tnni3_rt_m_f</i>	TCTGCAGATGCCATGATGC
	<i>Tnni3_rt_m_r</i>	TCGATATTCTTGGCGCCAGTC

Klonierungsprimer:**Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Klonierungsprimer.**

Gen	Primername	Sequenz 5'-3'
<i>DPF3</i>	H1_h_NheI_ATG_f1	AACTGCTAGCATGGCGACTGTCATTCACAA
<i>DPF3/1</i>	H1_h_EcoRI_stop_r1	TATTGAATTCTTAGCAACTGCCCTTTTTATCT
<i>DPF3/2</i>	H1_h_EcoRI_stop_r2	ATCTTGAATTCCTAGGCCTGGCAGCCAAAG

Sequenzierungsprimer:**Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten Sequenzierungsprimer.**

Gen	Primername	Sequenz 5'-3'
<i>DPF3</i>	hDpf3-seq-1	AGCTACCACTATGCTCACACT
<i>DPF3</i>	hDpf3-compl-seq-2	TGGTGCTCTCTGAGGTGAA

**3.5 Plasmide**

pIRES	Clontech
pIRES-EGFP3	
pIRES-EGFP3-DPF3/1-5	
pIRES-EGFP3-DPF3/2-Pfx-2	
pEGFP-N1	Clontech
pTL1-HA1-hDPF3/1	Christina Grimm
pCRII_TOPO_DPF3/2	Christina Grimm

### 3.6 Lösungen und Medien

5 x TBE	445 mM Tris 100 mM EDTA.Na <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 445 mM Borsäure pHWert 8,3
6 x Ladepuffer (50 ml)	50 mM Tris 30 % Glycerol Spatelspitze Bromphenolblau

#### 3.6.1 Medien zur Anzucht prokaryotischer Zellen

LB-Agar	LB-Medium mit 18 g/L Agar autoklavieren
LB-Medium	10 g/L Trypton 5 g/L NaCl 5 g/L Hefeextrakt pHWert 7,5 (NaOH) autoklavieren

LB<sub>Amp</sub>-Agar bzw. -Medium LB-Agar bzw. -Medium wurde nach dem autoklavieren ab einer Temperatur von ca. 60 °C mit Ampicillin versetzt (Endkonzentration von 100 µg/ml). Das LB<sub>Amp</sub>-Agar wurde in 9 cm Petrischalen gegossen, bei Raumtemperatur abgekühlt und bei 4 °C gelagert.

LB = Luria Broth

### 3.6.2 Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen

HL-1-Medium	450 ml Claycomb-Medium wurde frisch mit 50 ml FBS, 5 ml 10 mM Norepinephrin (Endkonzentration 0,1 mM) und 5 ml L-Glutamin 200 mM (Endkonzentration 2 mM) versetzt und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.
C2C12 Kryomedium	90 % FBS 10 % DMSO
DME-Medium	450 ml Dulbecco's Modified Eagles-Medium (DMEM) wurde frisch mit 50 ml FBS versetzt.
HL-1 Kryomedium	95 % FBS 5 % DMSO
L-Glutamin (200 mM)	L-Glutamin kommt als 200 mM Lösung, wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.
Norepinephrin (10 mM)	Norepinephrin wurde in 30 mM Ascorbinsäure angesetzt. Dafür löst man 0,295 g Ascorbinsäure in 50 ml destilliertem, sterilem, Zellkultur getesteten Wasser und versetzt davon 25 ml mit 0,08 g Norepinephrin. Die erhaltene Lösung wurde mit 0,2 µm Syringe Filter steril filtriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.
PBS	8 g/L NaCl 0,2 g/L KCl 0,2 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Anhydrid) 1,15 g/L Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Anhydrid)
Soybean Trypsin Inhibitor	Es wurden 12,5 mg Soybean Trypsin Inhibitor in 50 ml PBS gelöst und anschließend mit 0,2 µm Syringe Filter steril filtriert.
Trypsin/EDTA	0.5 g/L Trypsin 0,2 g/L EDTA*4Na in modifizierter Hank's Salzlösung

## **3.7 Zellbiologische Methoden**

### **3.7.1 HL-1 Zellen**

Die HL-1 Zelllinie wurde 1998 aus primären Kardiomyozyten der Maus etabliert (Claycomb *et al.*, 1998). HL-1 Zellen sind die ersten sekundären murinen Kardiomyozyten, welche den differenzierten kardialen Phänotyp und die kontrahierende Aktivität beibehalten. Bei den Zellen handelt es sich um adhärenzte Zellen und sie wurden von William C. Claycomb vom Health Sciences Center School of Medicine at New Orleans zur Verfügung gestellt.

### **3.7.2 Kultivierung von HL-1 Zellen**

Die Zellen wurden in 15 ml HL-1-Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer T-75 Flasche kultiviert und das Medium wurde täglich gewechselt.

Nach Erreichen von 100 % Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst. Dafür wurden die Zellen einmal mit 6 ml Trypsin/EDTA gespült, 2-3 min mit 3 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert, abgesaugt und nochmals 3-8 min mit 3 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert. Auf die abgelösten Zellen wurde 3 ml Soybean Trypsin-Inhibitor gegeben und anschließend 5 min bei 50 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden 1 : 5 geteilt.

### **3.7.3 Einfrieren von HL-1 Zellen**

1 x 10<sup>7</sup> Zellen wurden in 1 ml HL-1 Kryomedium suspendiert und in ein Kryovial gegeben. Das Kryovial wurde in ein Isopropanolbad (-1 °C/min) für 24 Stunden bei -80 °C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff (-196 °C) eingelagert.

### **3.7.4 Auftauen von HL-1 Zellen**

Die Zellen wurden im Wasserbad (37 °C) aufgetaut, in 5 ml HL-1-Medium suspendiert und 5 min bei 50 g abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml HL-1-Medium resuspendiert und in einer T-75-Flasche kultiviert.

### **3.7.5 Geneticin (G418) Dosiskurve von HL-1 Zellen**

Für die Bestimmung der Sensitivität von HL-1 Zellen gegenüber G418 wurden eine Woche lang HL-1 Zellen acht verschiedene G418 Konzentration ausgesetzt. Dafür wurden in 6-Well 1 x 10<sup>6</sup> Zellen ausgesät und über Nacht wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen folgenden G418 Konzentrationen ausgesetzt: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 und 1000 µg/ml. Es wurde jeden Tag das Medium mit entsprechender Konzentration gewechselt und die Zellen digital dokumentiert.

### **3.7.6 C2C12 Zellen**

Die Myoblastenzelllinie C2C12 wurde aus primären skelettalen Myoblasten etabliert, welche ursprünglich aus dem Mausstamm 129 ReJ isoliert worden

sind (Yaffe *et al.*, 1977). Die Myoblasten lassen sich durch Serumentzug auf 2 % Pferdeserum zu vielkernigen lang gestreckten Myotuben differenzieren. Beim Erreichen einer Konfluenz von über 60 % beginnen die Zellen ebenfalls mit der Differenzierung. Diese Myotuben entwickeln die für Skelettmuskelzellen typische quergestreifte Anordnung der kontraktile Elemente. Bei den Zellen handelt es sich um adhärente Zellen, welche von Jakob Schmidt von der State University of New York zur Verfügung gestellt wurden.

### **3.7.7 Kultivierung der C2C12 Zellen**

Die Zellen wurden in 12 ml Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM) versetzt mit 10 % FBS bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer T-75 Flasche kultiviert. Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt.

Nach Erreichen von 50 % Konfluenz wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Auf die abgelösten Zellen wurde 3 ml Soybean Trypsin-Inhibitor gegeben und anschließend 5 min bei 50 g zentrifugiert. Die Zellen wurden 1 : 10 geteilt.

### **3.7.8 Einfrieren von C2C12 Zellen**

$5 \times 10^6$  Zellen wurden in 1 ml C2C12 Kryomedium suspendiert und in ein Kryovial gegeben. Das Kryovial wurde in ein Isopropanolbad (-1 °C/min) für 24 Stunden bei -80 °C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff (-196 °C) eingelagert.

### **3.7.9 Auftauen von C2C12 Zellen**

Die Zellen wurden im Wasserbad (37 °C) aufgetaut, in 5 ml DMEM suspendiert und 5 min bei 50 g abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml DMEM resuspendiert und in einer T-75-Flasche kultiviert.

### **3.7.10 Zellzahlbestimmung mit Neubauer-Zählkammer**

Die Zellzahl wurde mit der Neubauer improved-Zählkammer bestimmt. Dabei wurde ein Aliquot fein suspendierter Zellen mit 1/5 Volumen Trypanblau gemischt und damit die Zählkammer gefüllt. Bei der Auszählung wurden Trypanblau negative Zellen als lebendig und positive als tote Zellen gezählt. Es wurden 8 Großquadrate ausgezählt und davon der Mittelwert gebildet. Zur Errechnung der Zellzahl pro ml wurde der gezählte Mittelwert mit dem Kehrwert des Kammerfaktors eines Großquadrates und dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Der Kammerfaktor ergibt sich aus dem Volumen des gezählten Quadrats (Quadratfläche x Quadrathöhe), welcher für das gezählte Großquadrat  $10^{-4}$  ml war. Dadurch ergibt sich folgende Formel:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Mittelwert} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### **3.7.11 Transfektion von siRNA in Säugetierzellen**

Zur Etablierung der Transfektion von HL-1 Zellen und C2C12 Zellen mit siRNA wurde eine Testreihe mit verschiedene Transfektionsreagenzien durchgeführt. Dabei wurde ein mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markiertes RNA-Oligo in verschiedenen Endkonzentrationen (40 nM & 80 nM) transfiziert. Nach 24 und 48 Stunden wurden unter einem

Fluoreszenzmikroskop Fotos gemacht und die Zellen ausgezählt. Die benutzten Reagenzien waren X-tremeGENE, Lipofectamine2000 mit Plus-Reagenz und GENESilencer, welche alle auf der Methode der Lipofektion basieren. Die Transfektion wurde in 24-Well-Platten durchgeführt und für HL-1 Zellen pro Well  $5 \times 10^4$  Zellen und für C2C12 Zellen  $2 \times 10^4$  Zellen ausgesät. Die Transfektion wurden nach den Angaben der einzelnen Hersteller durchgeführt.

Für die Transfektion von den funktionalen siRNAs in HL-1 Zellen wurde die Transfektion mit X-tremeGENE mit einer Endkonzentration von 80 nM in 6-Well-Platten durchgeführt. Pro Well wurden  $3 \times 10^5$  Zellen ausgesät und pro Ansatz 2-Wells verwendet. Es wurden die beiden funktionalen siRNAs gegen Dpf3/1 (AF362750\_Stealth\_962 & AF362750\_Stealth\_1115), eine negative Kontroll-siRNA und ein RNA-Oligo markiert mit FITC transfiziert. Die Transfektion wurde eine Stunde nach der Zellaussaat, nach Angaben des Herstellers mit einem siRNA ( $\mu\text{g}$ ) : X-tremeGENE ( $\mu\text{l}$ ) Ratio von 1 : 5 durchgeführt. Nach 48 Stunden Inkubation wurde das Medium gewechselt und nach 66 Stunden wurden die Zellen mit TRIzol geerntet. Dabei wurden die beiden 6-Wells in 1 ml TRIzol vereint.

### **3.7.12 Transfektion von Plasmid in Säugetierzellen**

Mit Hilfe der Amaxa-Nukleofektion wurde Plasmid in HL-1 Zellen transfiziert. Die Amaxa Technologie basiert auf einer Zusammensetzung von Elektroporation und zellspezifischen Lösungen. Diese Transfektionsmethode wurde speziell für die Transfektion von primären und schwer zu transfizierenden sekundären Zellen entwickelt. Die DNA wird dabei direkt in den Nukleus transfiziert.

Eine Testreihe mit verschiedenen Programmen von Amaxa wurde durchgeführt mit einem pmaxGFP Plasmid von Amaxa und zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen nach 48 Stunden unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Die Testreihe wurde in 6-Well-Platten durchgeführt und pro Well  $5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Es wurde die Lösung V

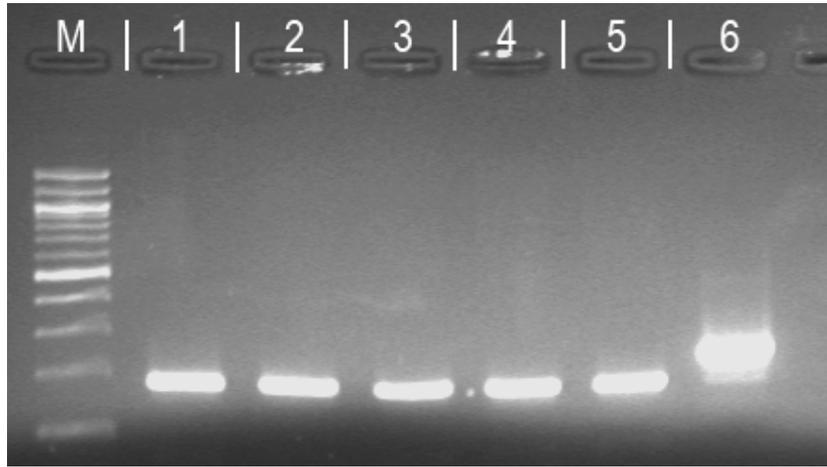
und 4 µg Plasmid pro Transfektion benutzt. Ansonsten wurde nach dem Angaben des Herstellers vorgegangen.

Für die transiente und die stabile Transfektion von DPF3/1 und DPF3/2 in HL-1 Zellen wurde das Programm A-33 mit der Lösung V benutzt. Beide Transfektionen wurden nach Hersteller Angaben in 6-Well-Platten mit  $5 \times 10^6$  Zellen durchgeführt. Für die transiente Transfektion wurde pro Ansatz 5 µg Plasmid und für die stabile Transfektion pro Ansatz 12,5 µg linearisiertes Plasmid eingesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Volumen des Plasmids 5 µl nicht übersteigt. Es wurden jeweils pIRES-EGFP3-DPF3/1-5, pIRES-EGFP-DPF3/2-Pfx-2 und als Negativ Kontrolle pIRES-GFP3 transfiziert.

### **3.7.13 Mykoplasmentest**

Mykoplasmen sind die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryonten und stehen in der mikrobiologischen Klassifizierung zwischen Bakterien und Viren. Sie besitzen keine Zellwand und ihr Durchmesser schwankt von 0,2 bis 2 µm. Mykoplasmen wachsen intrazellulär und ernähren sich parasitär von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten ihrer Wirtszelle. Sichtbare Merkmale von befallenen Zellen sind starke Vakuolisierung, abgerundete Zellen mit verminderter Adhärenz, sowie ein körniges Aussehen. Die Eingriffe der Mykoplasmen in den Stoffwechsel der Wirtszelle sind vielfältig, wobei am besten der Abbau von Arginin belegt ist. Dies führt zu veränderten Eigenschaften der befallenen Zellen, weshalb in Zellkulturexperimenten mit befallenen Zellen verfälschte Ergebnisse herauskommen können. Aus diesem Grund wurden die verwendeten Zellen auf eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Dafür wurde der Mykoplasmen-Nachweis für die konventionelle PCR Venor GeM benutzt. Der Test basiert auf der Amplifikation eines Abschnitts der 16S rRNA Region des Mykoplasmen-genoms und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden mehrere Zelllinien ( 2 x HL-1, C2C12 und HEK293) getestet, welche alle keine Kontaminationen aufwiesen. Im Falle einer

Kontamination sollte eine zusätzliche Bande in Höhe der Positiv Kontrolle sichtbar werden. Die Ergebnisse sind der Abbildung 4 zu entnehmen.



**Abbildung 4: Agarosegel des Mykoplasmentests.** M: 100Bp DNA Ladder; 1: Negativ Kontrolle; 2: HL-1 Zellen; 3: HL-1 Zellen; 4: HEK293 Zellen; 5: C2C12 Zellen; 6: Positiv Kontrolle.

### 3.8 Molekularbiologische Methoden

#### 3.8.1 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden Agarose-Gele verwendet. Im Allgemeinen wurden Gele mit einer Konzentration von 1-2 % Agarose benutzt. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 50 ml 0,5 x TBE-Puffer in der Mikrowelle gelöst, auf etwa 60 °C bei Raumtemperatur abgekühlt und eine Endkonzentration von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid eingestellt. Die Lösung wurde in entsprechende Kammern gegossen und bei Raumtemperatur zum Gel auspolymerisiert. 10-20 µl DNA-Probe wurde mit 6 x Ladepuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen, als

Standard wurden die 100 Bp DNA-Ladder und 1 kbp DNA-Ladder benutzt. Die Elektrophorese wurde in 0,5 x TBE-Puffer und bei 80 V vollzogen und anschließend unter UV-Licht mit dem GelDoc 2000 dokumentiert.

### **3.8.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Basen der Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm und Proteine besitzen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufgrund der aromatischen Reste von Tyrosin und Tryptophan. Die Konzentration und die Reinheit von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des Nanodrop photometrisch bestimmt. Durch die Absorption bei  $\lambda = 260$  nm wurde der Anteil an Nukleinsäuren bestimmt und mit Hilfe des Ratio zwischen 260 nm und 280 nm die Reinheit bestimmt. Dabei spricht ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0 für eine reine Probe.

### **3.8.3 RNA Isolierung aus HL-1 Zellen**

Bei dieser Arbeit ist es wichtig in einer RNase freien Umgebung zu arbeiten, weshalb die Oberflächen und benutzten Geräte mit RNase Away gesäubert wurden.

Es wurden  $\approx 1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml TRIzol mit einem Zellschaber abgelöst, in ein 2 ml Eppi überführt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 0,2 ml Chloroform dazugegeben, 15 Sek. geschüttelt und 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde bei 12.000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert und die obere Phase wurde in ein neues Eppi überführt und mit 0,5 ml Isopropanol für 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wurde erneut für 15 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 75 % EtOH in DEPC-Wasser gewaschen und 5 min bei 4 °C und 7.500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde

luftgetrocknet, in 50  $\mu$ l DEPC-Wasser aufgenommen und für 10 min bei 60 °C inkubiert.

### **3.8.4 DNase Verdau isolierter RNA**

Es wurden nicht mehr als 50  $\mu$ g RNA pro Ansatz verwendet. Die RNA wurde mit 1  $\mu$ l 0,1 M DTT, 10  $\mu$ l 10 x DNase Puffer, 5  $\mu$ l DNase (1 U/ $\mu$ l) und 2,5  $\mu$ l RNasin (40 U/ $\mu$ l) versetzt und mit DEPC-Wasser auf 100  $\mu$ l aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz bei 37 °C für 90 min inkubiert und mit 10  $\mu$ l Stoppsolution gestoppt.

### **3.8.5 RNA Aufreinigung mit Eppendorf PLG**

Die Phase Lock Gel (PLG) Tubes wurden kurz runterzentrifugiert und die 100  $\mu$ l aus dem DNase Verdau wurden im Tube mit 100  $\mu$ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt. Der Ansatz wurde bei 14.000 g für 5 min zentrifugiert, wodurch sich die wässrige Phase nun über dem Gel befand. Es wurden erneut 100  $\mu$ l Chloroform hinzugegeben und bei 14.000 g für 5 min zentrifugiert. Die gereinigte RNA befand sich über dem Gel, wurde abgenommen, gefällt und in DEPC-Wasser aufgenommen.

### **3.8.6 Nukleinsäure-Fällung**

Die Nukleinsäure-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc und der dreifachen Menge an 100 % EtOH versetzt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Beim RNA Ansatz wurde zusätzlich noch 1  $\mu$ l Glycogen hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung bei 16.000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert, das Pellet mit 75 % EtOH gewaschen und nochmals für 15 min

zentrifugiert. Das getrocknete DNA Pellet wurde in Endotoxin freien TE-Puffer aufgenommen und das RNA Pellet in DEPC-Wasser.

### 3.8.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR (Saiki *et al.*, 1988) wurde mit der PTC-225 durchgeführt und die Ansätze hatten im Allgemeinen ein Volumen von 25 µl mit folgender Zusammensetzung:

0,2 µl HotStar-Taq (5 U/µl)  
 2,5 µl 10 x Reaktionspuffer (QIAGEN)  
 2,0 µl dNTPs (25 mM)  
 1,0 µl Primer fwd (10 µM)  
 1,0 µl Primer rev (10 µM)  
 1,0 µl DNA-Template  
 auf 25 µl mit Bi-dest. H<sub>2</sub>O auffüllen

Üblicherweise wurde folgendes Programm benutzt:

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	95 °C	18 min	Enzymaktivierung
2	94 °C	30 Sek	Denaturierung
3	55 °C	30 Sek	Primer-Hybridisierung
4	72 °C	30 Sek	Elongation
5	zurück zu Schritt 2, 34 x		
6	72 °C	5 min	Elongation
7	4 °C	halten	

### **3.8.8 Reverse Transkriptase**

Für die Reverse Transkriptase wurden 5 µg RNA mit 2,5 µl d(T)-Primer (0,5 µg/µl) gemischt und auf 35 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 65 °C inkubiert und danach mit 20 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 20 µl dNTPs (25 mM), 20 µl AMV-Puffer (5 x) und 5 µl AMV-Reverse Transkriptase (10 U/µl) versetzt. Anschließend wurde der Ansatz 90 min bei 42 °C und 15 min bei 72 °C inkubiert. Zur Überprüfung des Vollständigen Dnase-Verdaus wurde eine Negativ Kontrolle ohne Enzym mitgeführt.

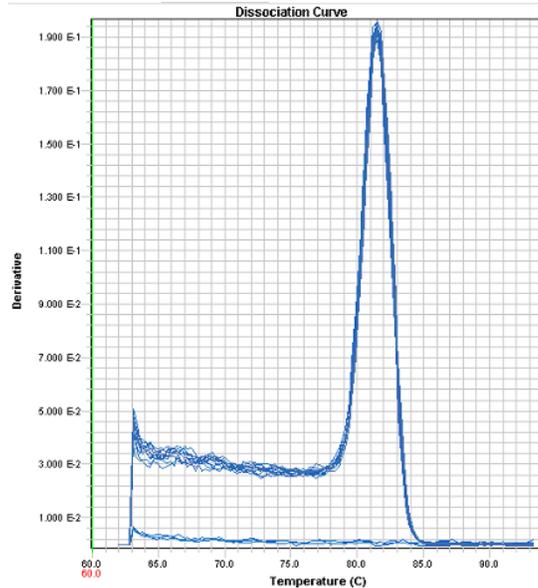
### **3.8.9 Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (Real-Time qPCR)**

Die Real-Time qPCR dient der Quantifizierung von cDNA Abschnitten innerhalb einer Probe. Sie beruht auf der kontinuierlichen Messung eines Fluoreszenzsignals, das während der PCR proportional mit der Menge des Amplifikationsproduktes ansteigt.

Die Quantifizierung der Real-Time qPCR wird über die Berechnung des Fluoreszenzschwellenwerts, dem so genannten Threshold Cycle (CT-Wert) erreicht. Der CT-Wert ist jener Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz den gesetzten Schwellenwert übersteigt.

Als interkalierender Farbstoff wurde Sybr-Green verwendet. Dieser Fluoreszenzfarbstoff lagert sich unspezifisch in Doppelstrang DNA ein, wodurch er zur Fluoreszenz befähigt wird. Dadurch kommt es proportional zum Anstieg des Amplifikationsproduktes zu einem Fluoreszenzanstieg. Der Vorteil von Sybr-Green ist die universelle Verwendbarkeit, da es unspezifisch eingebaut wird. Dieser unspezifische Einbau bringt allerdings den Nachteil mit sich, dass Artefakte oder Primerdimer ebenfalls zu einem Fluoreszenzsignal führen. Ein Ausschluss von Primerdimer ist mit Hilfe einer Dissoziationskurvenanalyse am Anschluss der qPCR möglich. Die Größenunterschiede von Primerdimer und Amplifikationsprodukt führen zu

unterschiedlichen Dissoziations Temperaturen und somit zu unterschiedlichen Dissoziationskurven. Bei einer einheitlichen Dissoziationskurve kann man die Anwesenheit von Primerdimer ausschließen (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5: Dissoziationskurve des Primers 1810007M14Rik\_m\_f4/r4.**

Ein weiteres Problem kann die unterschiedliche Effizienz der verwendeten Primer darstellen. Aus diesem Grunde wurde von jedem Primer eine Verdünnungsreihe erstellt und die Effizienz berechnet. Die Effizienz von den verwendeten Primer sollte um 2 liegen, d.h. eine Verdoppelung des Edukts pro Zyklus. Die Effizienz wurde nach folgender Formel berechnet:

$$E = 10^{-(1/\text{slope})}$$

Die verwendeten Primer hatten alle eine einheitliche Dissoziationskurve und eine Effizienz um den Wert 2.

Die Verdünnungsreihen sowie die Messungen wurden jeweils in Triplikaten angefertigt. Die Auswertung der Daten erfolgt mittels der vergleichenden CT-Methode, bei dem der Mittelwert und die Standardabweichung der einzelnen CT-Werte berechnet werden. Der Mittelwert wird entlogarithmiert. Der entlogarithmierte Mittelwert der negativen Kontrolle wird auf eins gesetzt und

die relativen Änderungen der anderen Messwerte zur negativen Kontrolle berechnet.

Die Messungen wurden mit folgendem Ansatz durchgeführt:

- 5 µl SybrGreen
- 0,5 µl Primer fwd ( 10 µM)
- 0,5 µl Primer rev ( 10 µM)
- 2 µl cDNA (1:10)
- auf 10 µl mit Chromatographie Wasser aufgefüllt

### **3.8.10 Klonierung**

Als Vektorsystem wurde der pIRES-Vektor von Clontech verwendet. Durch die „*Internal Ribosome Entry Site*“ (IRES) können zwei Proteine, welche unter der Kontrolle von einem Promotor stehen, als einzelne Proteine exprimiert werden. In den Vektor soll vor die IRES die humane cDNA von *DPF3/1* bzw. *DPF3/2* und hinter die IRES ein EGFP kloniert werden. Die humanen cDNAs wurden mittels PCR-Amplifizierung gewonnen und das EGFP wurde aus pEGFP-N1 von Clontech geschnitten.

Zur Vervielfältigung wurde der Vektor in *E.coli* Bakterien transformiert.

### **3.8.11 Transformation von Plasmiden**

Hitze-kompetente *E.colis* (DH10b) wurden auf Eis aufgetaut, davon 100 µl mit entsprechender Menge Plasmid gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sek ausgesetzt und wieder für 2 min auf Eis inkubiert. Es wurden 800 µl LB-Medium ohne Selektionsantibiotika auf die Bakterien gegeben und für 60 min bei 37 °C geschüttelt. Von diesem Ansatz wurden 100 µl auf eine LB-

Agarplatte mit Selektionsantibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Bei der Transformation von Plasmiden wurden 100 ng eingesetzt.

Bei Ligationsansätzen wurden 2 µl des Ansatzes zu den Bakterien gegeben und nach dem Inkubieren bei 37 °C wurde der Ansatz bei 2300 g für 5 min zentrifugiert. Das Volumen wurde auf 100 µl eingeengt, die Bakterien resuspendiert und auf eine Selektionsplatte ausgestrichen.

### **3.8.12 Übernachtskulturen von *E.coli***

Von der Selektionsplatte wurde 1 Klon gepickt und in 3 ml für Minis und 50 ml für Midis LB-Medium mit Selektionsantibiotika über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

Für Maxis wurde zuvor eine Startkultur (2 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotika) angeimpft und für 6-8 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Von der Startkultur wurde 1 ml in 100 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotika verdünnt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

### **3.8.13 Glycerolstocks von *E.coli***

Von der Übernachtskultur wurde 1 ml mit 1 ml Glycerin (50 %) in einem Kryovial gevortext, auf Trockeneis gelegt und als Glycerolstock bei -80 °C gelagert.

### 3.8.14 Plasmidaufreinigung aus *E.coli*

Die Minis wurden nach Herstellerangaben mit dem Perfectprep Plasmid Mini-Kit von Eppendorf, die Midis nach Herstellerangaben mit dem Perfectprep Plasmid Midi-Kit von Eppendorf und die Maxis nach Herstellerangaben mit dem Endofree Plasmid Maxi Kit von QIAGEN aufgereinigt.

### 3.8.15 Amplifizierung der cDNA-Sequenzen

Mit Hilfe der PCR-Methode wurden die humanen cDNA-Sequenzen von *DPF3/1* aus dem Plasmid pTL1-HA1-hDPF3/1 und von *DPF3/2* aus dem Plasmid pCRII\_TOPO\_DPF3/2 amplifiziert. Für die Amplifizierung von *DPF3/1* wurden die Primer H1\_h\_NheI\_ATG\_f1 und H1\_h\_EcoRI\_stop\_r1 und für *DPF3/2* die Primer H1\_h\_NheI\_ATG\_f1 und H1\_h\_EcoRI\_stop\_r2 benutzt. Dadurch wurden die beiden cDNA-Sequenzen am 5'-Ende von der NheI-Schnittstelle und am 3'-Ende von der EcoRI-Schnittstelle flankiert. Die PCR wurde nach folgendem Ansatz durchgeführt:

#### *DPF3/1*

- 2 µl pTL1-HA1-hDPF3/1 (6 ng/µl)
- 2 µl H1\_h\_NheI\_ATG\_f1 (10 µM)
- 2 µl H1\_h\_EcoRI\_stop\_r1 (10 µM)
- 5 µl 10 x Reaktionspuffer (QIAGEN)
- 3 µl dNTP's (25 mM)
- 0,3 µl HotStar-Taq (5 U/µl)
- auf 50 µl mit H<sub>2</sub>O Bi-dist. auffüllen

Das benutzte PCR-Programm war:

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	
1	95 °C	18 min	Enzymaktivierung
2	94 °C	30 Sek	Denaturierung
3	55 °C	30 Sek	Primer-Hybridisierung
4	72 °C	30 Sek	Elongation
5	zurück zu Schritt 2, 39 x		
6	72 °C	5 min	Elongation
7	4 °C	halten	

### **DPF3/2**

2 µl pCRII\_TOPO\_DPF3/2 (14,5 ng/µl)  
 1,5 µl H1\_h\_NheI\_ATG\_f1 (10 µM)  
 1,5 µl H1\_h\_EcoRI\_stop\_r2 (10 µM)  
 5 µl 10 x Pfx Amplification Buffer  
 2,5 µl dNTP's (25 mM)  
 0,5 µl Platinum-Pfx DNA Polymerase (2,5 U/µl)  
 auf 50 µl mit H<sub>2</sub>O Bi-dest. Auffüllen

Das benutzte PCR-Programm war:

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	
1	95 °C	2 min	Denaturierung
2	94 °C	30 Sek	Denaturierung
3	55 °C	30 Sek	Primer-Hybridisierung
4	68 °C	80 Sek	Elongation
5	zurück zu Schritt 2, 34 x		
6	68 °C	5 min	Elongation
7	4 °C	halten	

Nach der PCR wurden die Produkte mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System aufgereinigt und mit den Enzymen NheI und EcoRI geschnitten.

### **3.8.16 Restriktion**

Restriktionen wurden mit den Enzymen und den dazugehörigen Puffer von New England Biolabs durchgeführt. Doppelverdau wurden im vorgeschlagenen Puffer vom Hersteller angesetzt und es wurde grundsätzlich die 4 bis 5 fache Menge an Units eingesetzt. Das Volumen an eingesetztem Enzym hat nie mehr als 10 % vom Gesamtansatz betragen.

Die Ansätze wurden für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Das EGFP wurde aus 10 µg pEGFP-N1-Vektor mit Sall und NotI geschnitten und anschließend über ein Gel aufgereinigt.

Der pIRES-Vektor wurde für die Klonierung von EGFP mit Sall und NotI und für die Klonierung von den humanen *DPF3/1* und *DPF3/2* cDNAs mit NheI und EcoRI verdaut. Der Vektor wurde im Anschluß an den Verdau dephosphoryliert.

### **3.8.17 Dephosphorylierung von geschnittenen Vektoren**

Es wurde zum Restriktionsansatz 1 µl Antarctic Phosphatase (5 U/µl) hinzu gegeben und für 30 min bei 37 °C dephosphoryliert.

### 3.8.18 Ligation

Die Ligationen wurden im Verhältnis von 3 : 1 Insert zu Vektor durchgeführt. Dabei wurden jeweils 100 ng Vektor eingesetzt und die Menge an einzusetzendem Insert nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{ng Vektor} * \text{Bp Insert}}{\text{Bp Vektor}} * 3 = \text{ng Insert}$$

#### Ligationsansatz

1 µl T4 Ligase (3 U/µl)  
1 µl T4 Ligase Buffer (10x)  
100 ng Vektor  
x ng Insert  
auf 10 µl H<sub>2</sub>O Bi-dest. auffüllen

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C oder für 30 min bei 37 °C inkubiert und es wurde immer eine Negativ Ligation ohne Insert mitgeführt.

### 3.8.19 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen der Vektoren erfolgte mit Hilfe der ABI1373 Big-Dye-Terminator-Chemie. Die Sequenzierungen wurden von der Firma *SMB Services in Molecular Biology* in Berlin durchgeführt. Die benutzten Primer wurden zum größten Teil von der Firma SMB bereitgestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierung der Transfektion von siRNA in HL-1 und C2C12 Zellen

Für die Etablierung der Transfektion von HL-1 Zellen und C2C12 Zellen mit siRNA wurde eine Testreihe mit verschiedenen Transfektionsreagenzien durchgeführt. Dabei wurde ein mit FITC markiertes RNA-Oligo in verschiedenen Endkonzentrationen (40 nM & 80 nM) transfiziert. In dieser Testreihe wurde die Toxizität (Anzahl toter Zellen in Bezug zur Gesamtzellzahl), die Effizienz (Anzahl lebender transfizierter Zellen in Bezug zur lebenden Gesamtzellzahl) und eine weitere Kategorie namens „Pünktchen“ (Anzahl lebender Zellen mit FITC-Lipid-Komplex an der Zellmembran in Bezug zur lebenden Gesamtzellzahl) bestimmt. Zellen, welche nach 20 Stunden nicht angewachsen waren wurden als tote Zellen deklariert. Zur Bestimmung der Toxizität wurden nach 20 Stunden Fotos von den ungewaschenen Zellen gemacht und anschließend ausgezählt. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen. Für die Effizienz und die Kategorie „Pünktchen“ wurden nach 24 und 48 Stunden Fotos von gewaschenen Zellen gemacht und ausgezählt.

Bei den HL-1 Zellen war für die Transfektion mit dem Reagenz X-tremeGENE die geringste Toxizität, sowohl für die niedrige (51 % Toxizität) als auch für die hohe (60 % Toxizität) Konzentration, festzustellen. Die anderen Reagenzien wiesen eine Toxizität zwischen 80 und 90 % auf. Bei den untransfizierten Zellen wuchsen 25 % der ausgesäten Zellen nicht an (siehe Tabelle 5).

Die höchste Effizienz von 79 % wurde für die HL-1 Zellen nach 48 Stunden mit dem Reagenz X-tremeGENE mit einer Konzentration von 80 nM erreicht (siehe Abbildung 6). Die gesamten Daten sind den Tabellen 6 & 7 zu entnehmen.

**Tabelle 5: Toxizität der einzelnen Transfektionsreagenzien bei HL-1 Zellen.** Es ist der prozentuale Anteil und die absolute Zahl von toten Zellen zur Gesamtzellzahl angegeben. Des Weiteren ist die Zahl lebender Zellen pro mm<sup>2</sup> aufgeführt.

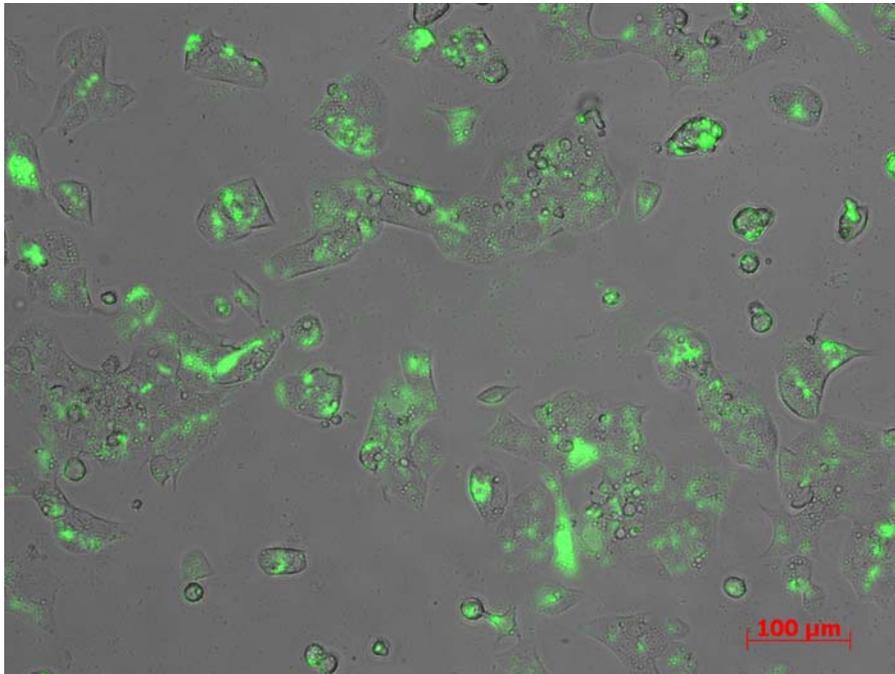
HL-1 Zellen, Toxizität				
		Toxizität	tote Zellen / Gesamtzellzahl	lebende Zellen / mm <sup>2</sup>
X-tremeGENE	40 nM	51 %	51 / 91	81
	80 nM	60 %	112 / 186	62
LipoPlus	40 nM	78 %	79 / 101	19
	80 nM	82 %	108 / 131	19
GeneSilencer	40 nM	91 %	171 / 188	14
untransfiziert		25 %	164 / 673	

**Tabelle 6: Transfektionseffizienzen der einzelnen Transfektionsreagenzien bei HL-1 nach 24 Stunden.** Es sind die prozentualen Anteile der Kategorien „Effizienz“ und „Pünktchen“, die Zahl lebender Zellen pro mm<sup>2</sup> und die Gesamtzahl lebender Zellen aufgeführt.

HL-1 Zellen, Transfektionseffizienz nach 24 Stunden					
		Effizienz	Pünktchen	lebende Zellen / mm <sup>2</sup>	lebende Gesamtzellzahl
X-tremeGENE	40 nM	16 %	61 %	103	122
	80 nM	42 %	45 %	93	110
LipoPlus	40 nM	63 %	25 %	51	60
	80 nM	73 %	8 %	22	26
GeneSilencer	40 nM	33 %	50 %	20	24

**Tabelle 7: Transfektionseffizienzen der einzelnen Transfektionsreagenzien bei HL-1 nach 48 Stunden.** Es sind die prozentualen Anteile der Kategorien „Effizienz“ und „Pünktchen“, die Zahl lebender Zellen pro mm<sup>2</sup> und die Gesamtzahl lebender Zellen aufgeführt.

HL-1 Zellen, Transfektionseffizienz nach 48 Stunden					
		Effizienz	Pünktchen	lebende Zellen / mm <sup>2</sup>	lebende Gesamtzellzahl
X-tremeGENE	40 nM	10 %	82 %	212	252
	80 nM	79 %	7 %	205	609
LipoPlus	40 nM	45 %	22 %	72	170
	80 nM	58 %	32 %	66	118
GeneSilencer	40 nM	32 %	63 %	16	19



**Abbildung 6: HL-1 Zellen transfiziert mit X-tremeGENE 80 nM FITC nach 48 Stunden.**

Die C2C12 Zellen wiesen für X-tremeGENE mit der hohen Konzentration eine Toxizität von 55 % auf. Für die anderen Ansätze schwankte die Toxizität um 20 % und von den untransfizierten Zellen wuchsen 7 % der Zellen nicht an (siehe Tabelle 8). Die höchste Effizienz für die C2C12 Zellen wurde nach 48 Stunden mit X-tremeGENE für beide Konzentrationen erreicht (siehe Abbildung 7). Die gesamten Daten sind aus den Tabellen 9 & 10 zu entnehmen.

**Tabelle 8: Toxizität der einzelnen Transfektionsreagenzien bei C2C12 Zellen.** Es ist der prozentuale Anteil und die absolute Zahl von toten Zellen zur Gesamtzellzahl angegeben. Des Weiteren ist die lebende Zellzahl pro mm<sup>2</sup> aufgeführt.

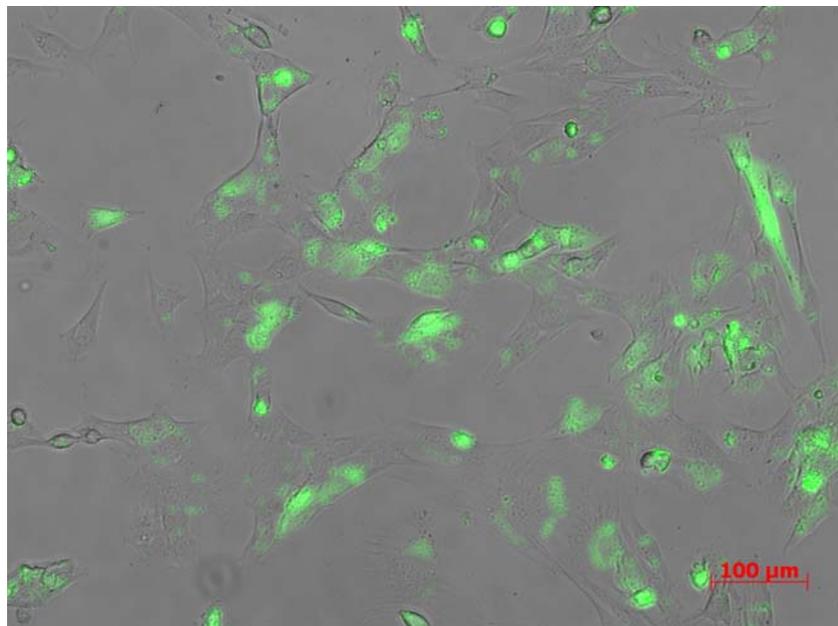
C2C12 Zellen, Toxizität				
		Toxizität	tote Zellen / Gesamtzellzahl	lebende Zellen/mm <sup>2</sup>
X-tremeGENE	40 nM	29 %	29 / 100	60
	80 nM	55 %	69 / 125	47
LipoPlus	40 nM	23 %	15 / 66	43
	80 nM	25 %	17 / 68	43
GeneSilencer	40 nM	13 %	13 / 100	73
untransfiziert		7 %	46 / 717	

**Tabelle 9: Transfektionseffizienzen der einzelnen Transfektionsreagenzien bei C2C12 nach 24 Stunden.** Es sind die prozentualen Anteile der Kategorien „Effizienz“ und „Pünktchen“, die Zahl lebender Zellen pro mm<sup>2</sup> und die Gesamtzahl lebender Zellen aufgeführt.

C2C12 Zellen, Transfektionseffizienz nach 24 Stunden					
		Effizienz	Pünktchen	lebende Zellen / mm <sup>2</sup>	lebende Gesamtzellzahl
X-tremeGENE	40 nM	58 %	22 %	62	74
	80 nM	79 %	18 %	24	28
LipoPlus	40 nM	28 %	35 %	36	43
	80 nM	26 %	50 %	35	42
GeneSilencer	40 nM	41 %	39 %	43	51

**Tabelle 10: Transfektionseffizienzen der einzelnen Transfektionsreagenzien bei C2C12 nach 48 Stunden.** Es sind die prozentualen Anteile der Kategorien „Effizienz“ und „Pünktchen“, die Zahl lebender Zellen pro mm<sup>2</sup> und die Gesamtzahl lebender Zellen aufgeführt.

C2C12 Zellen, Transfektionseffizienz nach 48 Stunden					
		Effizienz	Pünktchen	lebende Zellen / mm <sup>2</sup>	lebende Gesamtzellzahl
X-tremeGENE	40 nM	70 %	5 %	170	403
	80 nM	91 %	3 %	27	32
LipoPlus	40 nM	19 %	58 %	81	145
	80 nM	37 %	25 %	57	68
GeneSilencer	40 nM	40 %	6 %	174	310

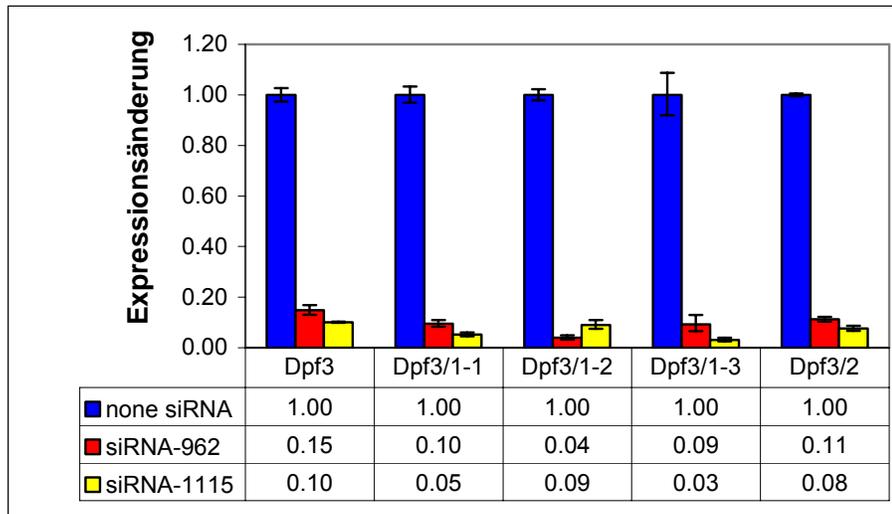


**Abbildung 7: C2C12 Zellen transfiziert mit X-tremeGENE 40 nM FITC nach 48 Stunden**

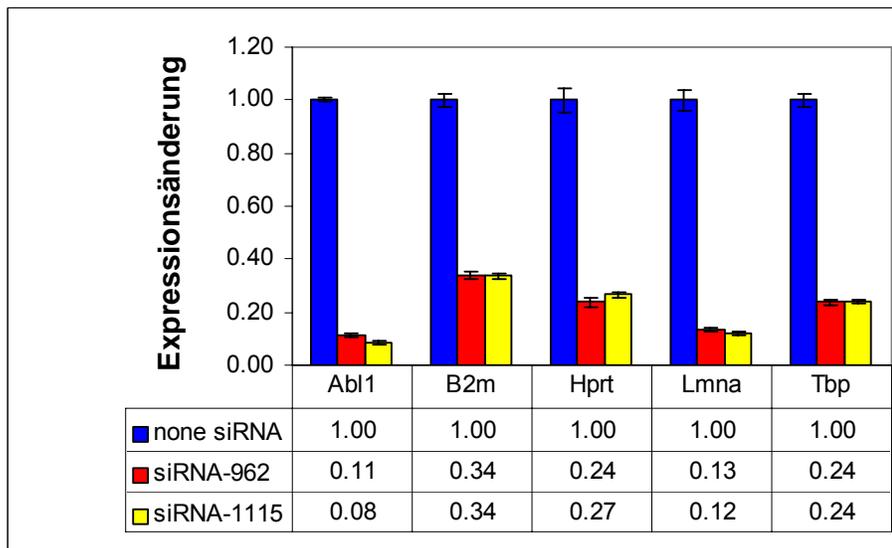
## 4.2 RNAi vermittelter Abbau von Dpf3/1 in HL-1 Zellen

Mit Hilfe des RNAi Mechanismus wurde in HL-1 Zellen der potentielle Transkriptionsfaktor Dpf3/1 abgebaut. Dafür wurden zwei unterschiedliche siRNAs gegen *Dpf3/1* verwendet. Der Nachweis erfolgte auf mRNA-Ebene mittels der Real-Time qPCR. In der Abbildung 8 ist die Veränderung des mRNA-Levels von *Dpf3/1* im Vergleich zur Negativ Kontrolle (none siRNA) dargestellt. Als Negativ Kontrolle diente eine siRNA, welche keine Sequenzhomologie zum Mausgenom besitzt und den gleichen GC-Gehalt wie die verwendeten siRNAs gegen *Dpf3/1* aufweist. Auf der Ebene der mRNA ist eine Degradierung von *Dpf3/1* für beide verwendeten siRNAs von 90 % zu beobachten. Zur Messung des mRNA-Levels von *Dpf3/1* wurden drei verschiedene Primerpaare benutzt. Das Primerpaar für Dpf3/1-2 amplifizierte die Binderegion der siRNA- AF362750\_Stealth\_962 (siRNA-962) und das Primerpaar für Dpf3/1-3 amplifizierte die Binderegion der siRNA- AF362750\_Stealth\_1115 (siRNA-1115). Außerdem wurde das mRNA-Level von *Dpf3* allgemein und von *Dpf3/2* gemessen (siehe Abbildung 8). Für *Dpf3/2* wurde ebenfalls eine Reduktion der mRNA Expression von 90 % für beide siRNAs gemessen. Die gemessenen Werte für *Dpf3* allgemein entsprechen etwa den addierten Werten der einzelnen Isoformen.

Des Weiteren wurden in den Proben mehrere Haushaltsgene gemessen. Dabei verhielten sich die gemessenen Werte für beide siRNAs gegen *Dpf3/1* immer gleich. Der geringste Unterschied auf der mRNA-Ebene im Vergleich zur Negativ Kontrolle wurde für B2m (65 %) gemessen. Die beiden Gene Hprt und Tbp wiesen einen Unterschied von 75 % und die beiden Genen Abl1 und Lmna einen Unterschied von 90 % im Vergleich zur Negativ Kontrolle auf. Die genauen Daten sind der Abbildung 9 zu entnehmen.



**Abbildung 8: *Dpf3* mRNA Levels in siRNA behandelten HL-1 Zellen.** Dargestellt sind die entlogarithmierten Mittelwerte im Vergleich zur Negativ Kontrolle  $\pm$  Standardabweichung für *Dpf3* allgemein, *Dpf3/1* und *Dpf3/2*.



**Abbildung 9: mRNA Levels einzelner Haushaltsgene in siRNA behandelten HL-1 Zellen.** Dargestellt sind die entlogarithmierten Mittelwerte im Vergleich zur Negativ Kontrolle  $\pm$  Standardabweichung.

### 4.3 siRNA vermittelte Interferon-Antwort

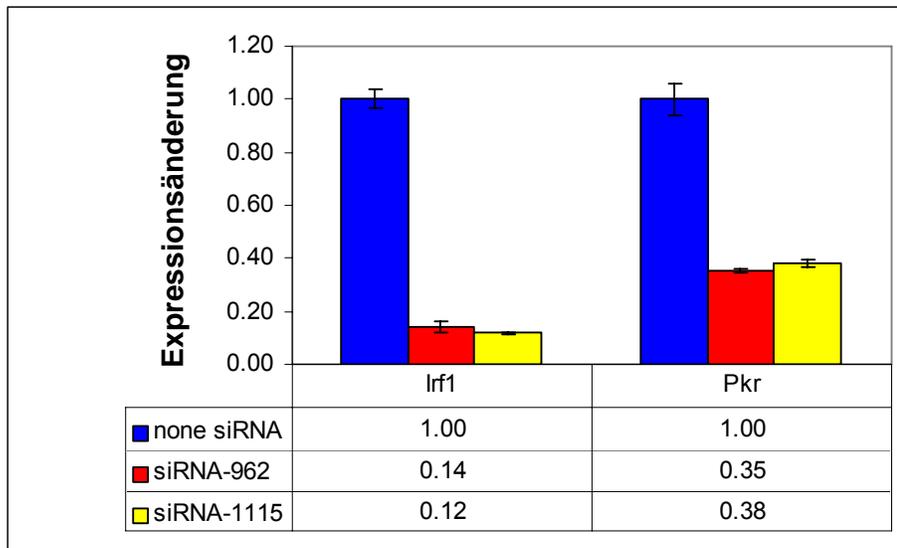
Interferone sind Teil einer Immunantwort in Säugetierzellen gegen virale Infektion. Diese angeborene Immunantwort wird zum Teil durch dsRNA induziert. Die Bindung von dsRNA an dsRNA-abhängige Proteinkinase (Pkr) induziert eine Autophosphorylierung und das aktivierte Pkr führt zur Hochregulation von *Ifn-β*. Dadurch wird der Jak-Stat-Signalweg und eine globale Hochregulation von Interferon stimulierten Genen (ISG) induziert. Als Folge wird die Proteintranslation inhibiert und RNA degradiert. Es wurde gezeigt, dass die Interferon-Antwort ebenfalls durch 21-nt-lange siRNAs induziert werden kann (Sledz *et al.*, 2003). Bei der Verwendung von siRNA kann es somit zur unspezifischen Degradation von RNA durch eine Interferon-Antwort kommen und somit zu verfälschten Ergebnissen. Die in diesem Versuch verwendete siRNA soll durch chemische Modifikation keine Interferon-Antwort in Säugetierzellen auslösen (Edenson, 2004).

Zur Messung einer möglichen Interferon-Antwort in den mit den beiden siRNA transfizierten HL-1 Zellen wurde die Expression von zwei ISGs (siehe Tabelle 11) gemessen und mit der Negativ Kontrolle verglichen.

**Tabelle 11: Beschreibung der verwendeten ISGs.**

Gen	Gennamen	Beschreibung
<i>Irf1</i>	interferon regulatory factor 1	Aktivierung durch <i>Ifn-β</i> , ist ein transkriptionaler Aktivator von ISG
<i>Pkr</i>	dsRNA-dependent protein kinase	Aktivierung durch dsRNA, führt zur Autophosphorylierung und anschließender Phosphorylierung vom Eukaryotischen Initiationsfaktor 2α

In der Abbildung 10 sind die jeweiligen RNA-Levels der beiden ISGs abgebildet. Für beide ist eine Reduktion im Vergleich zur Negativ Kontrolle festzustellen.



**Abbildung 10: mRNA Levels der beiden ISGs in siRNA behandelten HL-1 Zellen.** Dargestellt sind die entlogarithmierten Mittelwerte im Vergleich zur Negativ Kontrolle  $\pm$  Standardabweichung.

#### 4.4 Auswahl möglicher Zielgene von Dpf3/1

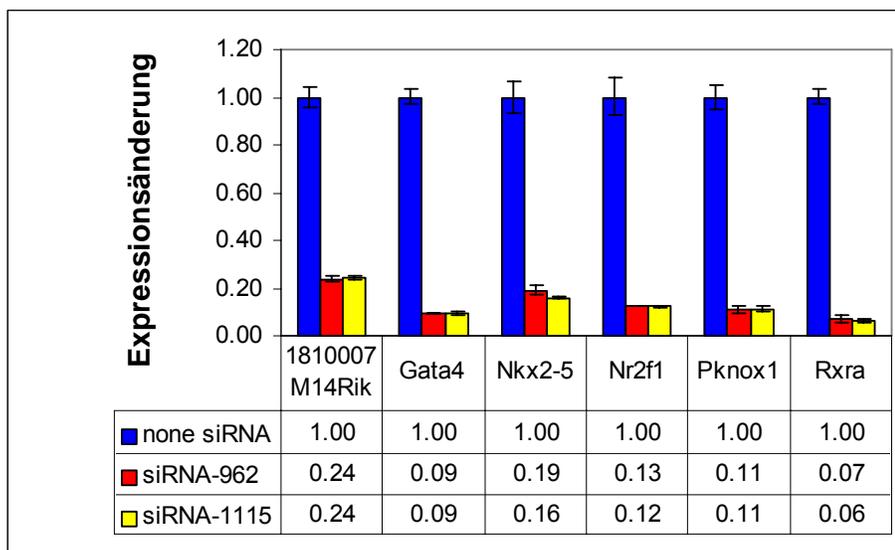
Für die Analyse möglicher Zielgene von Dpf3/1 wurden Gene ausgewählt, mit unterschiedlichen Funktionen, wie Transkriptionsfaktoren, Strukturproteine des Cytoskeletts und Signalproteine. Außerdem wurde eine Gruppe von Genen untersucht (Dpf3/1 assoziierte Gene), welche in zwei vorangegangenen Experimenten zur Identifizierung möglicher Zielgene von Dpf3/1 identifiziert wurden. Zum einen waren sie differentiell exprimiert zwischen Wildtyp-Mäusen und Dpf3/1-*knock-out*-Mäusen und zum anderen waren sie bei einem ChIP on Chip Experiment angereichert (Fischer *et al.*, unveröffentlicht). Die verwendeten Gene sind in der Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Liste möglicher Zielgene von Dpf3/1.

<b>Gensymbol</b>	<b>Genname</b>
<b>Transkriptionsfaktoren</b>	
<i>1810007M14Rik</i>	1810007M14Rik
<i>Gata4</i>	GATA-binding protein 4
<i>Nkx2-5</i>	Nk2 transcription factor related
<i>Nr2f1</i>	nuclear receptor subfamily 2
<i>Pknox1</i>	Pbx/knotted 1 homeobox
<i>Rxra</i>	retinoidX receptor alpha
<b>Strukturproteine des Cytoskeletts</b>	
<i>Acta1</i>	actin alpha 1, skeletal muscle
<i>Myl1</i>	myosin light polypeptide 1
<i>Tnni1</i>	troponin I, skeletal, slow 1
<i>Tnni3</i>	troponin I, cardiac
<b>Signalproteine</b>	
<i>Bmp4</i>	bone morphogenetic protein 4
<i>CamK2b</i>	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
<i>Nppa</i>	natriuretic peptide precursor type A
<i>Smad3</i>	mother against decapentaplegic homolog 3
<b>Dpf3/1 assoziierte Gene</b>	
<i>Adam9</i>	a disintegrin and metallopeptidase domain 9
<i>Capn2</i>	calpain 2
<i>Efnb2</i>	ephrin B2
<i>Emp1</i>	epithelial membrane protein 1
<i>Morf4l2</i>	mortality factor 4 like 2
<i>Tank</i>	TRAF family member-associated NF-kappa $\beta$ activator

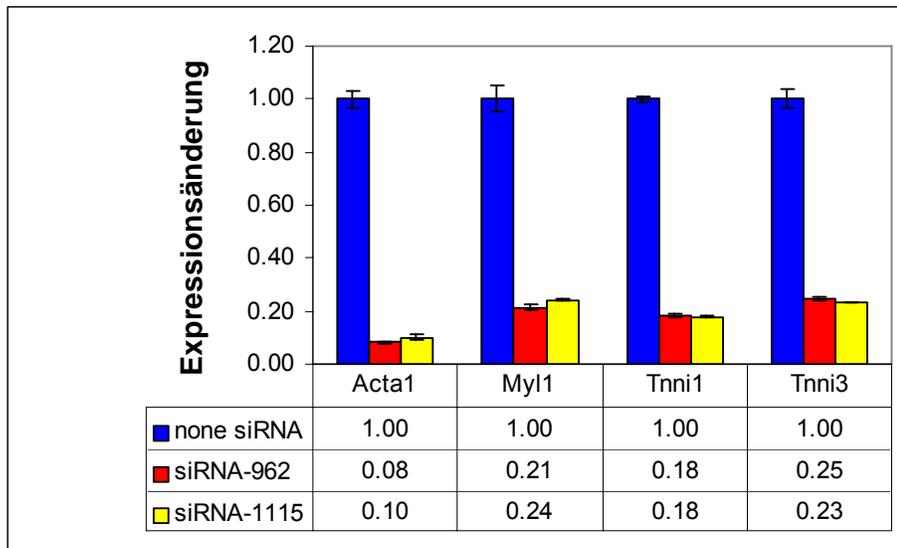
#### 4.5 Expression möglicher Zielgene in HL-1 Zellen mit einem RNAi vermittelten Abbau von Dpf3/1

In HL-1 Zellen mit einem RNAi vermittelten Abbau von Dpf3/1 wurde die mRNA möglicher Zielgene von Dpf3/1 mittels Real-Time qPCR quantifiziert. Die Zellen wurden mit zwei verschiedenen siRNAs gegen *Dpf3/1* transfiziert. Die gemessenen Expressionswerte von allen potentiellen Zielgenen von Dpf3/1 unterscheiden sich zwischen den beiden verwendeten siRNAs nicht. Bei den gemessenen Transkriptionsfaktoren ist immer eine Reduktion der mRNA Expression im Vergleich zur Negativ Kontrolle festzustellen. Die Werte variieren dabei zwischen 75 % und 95 %. Die genauen Werte sind der Abbildung 11 zu entnehmen.

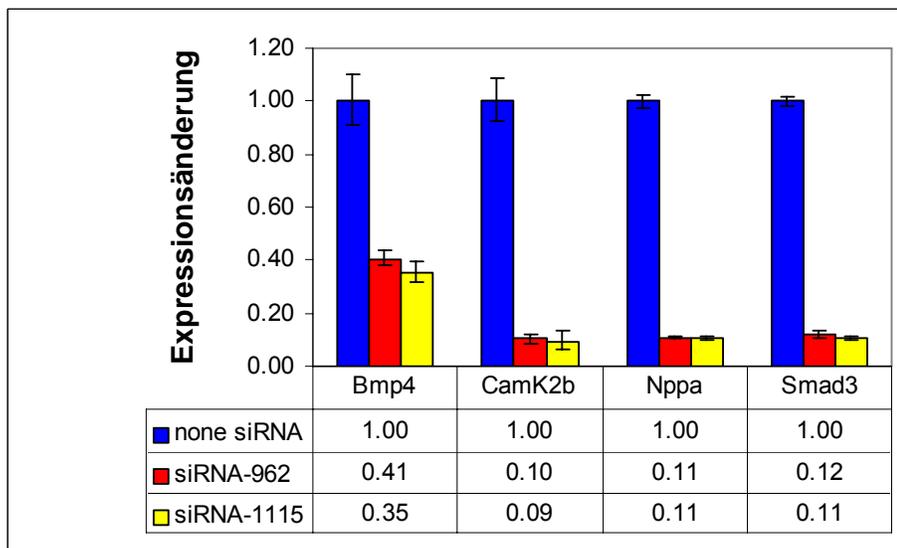


**Abbildung 11: mRNA Levels einzelner Transkriptionsfaktoren in siRNA behandelten HL-1 Zellen.** Dargestellt sind die entlogarithmierten Mittelwerte im Vergleich zur Negativ Kontrolle  $\pm$  Standardabweichung.

Für die Gene des Cytoskeletts ist ebenfalls eine Reduktion des mRNA Levels zwischen 75 % und 90 % festzustellen, die gemessenen Werte sind in Abbildung 12 dargestellt. Bei den Signalproteinen ist für Bmp4 eine Reduktion der mRNA Expression von 60 % und für den Rest von 90 % festzustellen (siehe Abbildung 13).

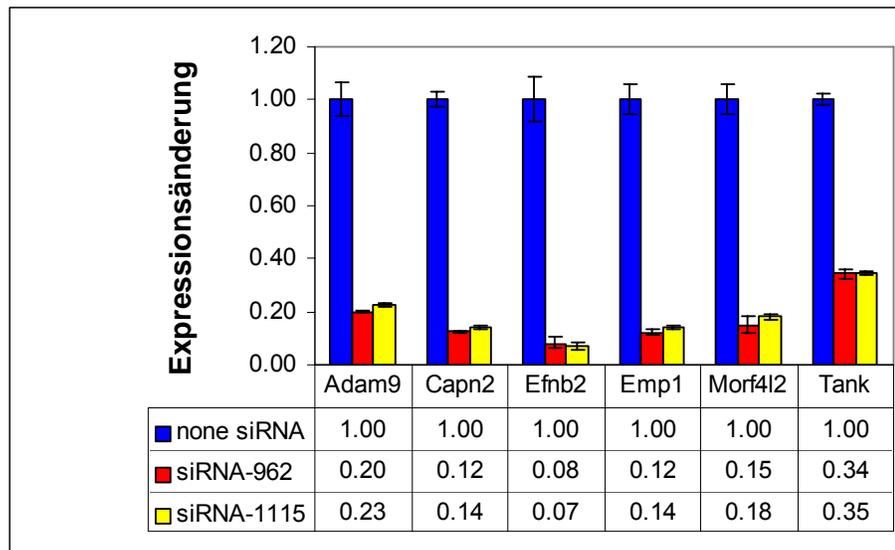


**Abbildung 12: mRNA Levels einzelner Gene des Cytoskeletts in siRNA behandelten HL-1 Zellen.** Dargestellt sind die entlogarithmierten Mittelwerte im Vergleich zur Negativ Kontrolle  $\pm$  Standardabweichung.



**Abbildung 13: mRNA Levels einzelner Signalproteine in siRNA behandelten HL-1 Zellen.** Dargestellt sind die entlogarithmierten Mittelwerte im Vergleich zur Negativ Kontrolle  $\pm$  Standardabweichung.

Für die Gene aus der Gruppe Dpf3/1 assoziierte Gene wurde ebenfalls eine Reduktion des mRNA Levels zur Negativ Kontrolle festgestellt. Die Werte variieren dabei zwischen 80 % und 90 %. Beim Gen Tank wurde eine geringere Reduktion der mRNA Expression von 65 % gemessen (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14: mRNA Levels von Genen aus der Gruppe Dpf3/1 assoziierte Gene in siRNA behandelten HL-1 Zellen.** Dargestellt sind die entlogarithmierten Mittelwerte im Vergleich zur Negativ Kontrolle  $\pm$  Standardabweichung.

## 4.6 Etablierung der Transfektion von Plasmiden in HL-1 Zellen

Zur Etablierung der Transfektion von der HL-1 Zelllinie mit Plasmid wurde die Nukleofektions-Technologie von Amaxa benutzt. Es wurde eine Testreihe mit verschiedenen Programmen von Amaxa durchgeführt und die Effizienzen ermittelt. Die beste Effizienz von 43 % wurde mit dem Programm A-33 und der Lösung V für die HL-1 Zellen erreicht. Anschließende Transfektionen wurden mit diesem Aufbau durchgeführt. Die gesamten Daten sind aus der Tabelle 13 zu entnehmen.

**Tabelle 13: Transfektionseffizienzen von Plasmid in HL-1 Zellen mit verschiedenen Amaxa-Programmen.**

<b>Amaxa Programm</b>	<b>Beobachtete Effizienz</b>	<b>Ausgezählte Effizienz</b>	<b>Beobachtete Lebensfähigkeit</b>
A-27	+		+
A-33	++	47 %	++
C-13	+		++
B-33	+(+)	37 %	-
X-01	+		++
N-09	+		++
R-04	-		+++
S-04	-		+++

#### **4.7 G418 Dosiskurve für HL-1 Zellen**

Zur Bestimmung der Sensitivität von HL-1 Zellen gegenüber Geneticin (G418) wurde eine Dosiskurve angefertigt. Die Ergebnisse wurden in Form von abnehmender Zellzahl (Konfluenz) und veränderter Morphologie der Zellen festgehalten. Die Konfluenz gibt dabei die prozentuale Fläche mit Zellen im Vergleich zur Gesamtfläche an. Des Weiteren wurden zu jedem Zeitpunkt die Zellen digital dokumentiert.

Zum Zeitpunkt Null hatten die Zellen eine Konfluenz von 90% und eine normale Morphologie. Nach 24 Stunden waren bis zur Konzentration von 400 µg/ml keine Unterschiede zur Negativ Kontrolle festzustellen, welche nun eine Konfluenz von 98 % aufwies. Bei den höheren Konzentrationen war eine verstärkte Vesikelbildung in den Zellen zu beobachten und eine abnehmende Konfluenz. Bei einer Konzentration von 1000 µg/ml waren die Zellen nur noch 75 % konfluent. Nach 48 Stunden war bei der niedrigsten Konzentration von 100 µg/ml kein Unterschied zur Negativ Kontrolle zu beobachten, welche eine Konfluenz von 100 % besaß. Ab der Konzentration von 200 µg/ml war verstärkte Vesikelbildung und eine stetig abnehmende Konfluenz zu

beobachten. Für die Konzentration von 400  $\mu\text{g/ml}$  war nur noch eine Konfluenz von 30 % und eine leicht veränderte Morphologie festzustellen. Ab der Konzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$  waren nach 48 Stunden alle Zellen abgestorben. Nach 72 Stunden war bei den Zellen mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  eine leicht abnehmende Konfluenz und für die Zellen mit einer Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  eine Konfluenz von 10 % zu beobachten. Ab einer Konzentration von 300  $\mu\text{g/ml}$  waren alle Zellen abgestorben. Nach 96 Stunden war bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  eine Konfluenz von 40 % und eine leicht veränderte Morphologie festzustellen. Ab 200  $\mu\text{g/ml}$  waren nach 96 Stunden alle Zellen abgestorben. Der Versuch wurde nach 96 Stunden abgebrochen. Eine Zusammenstellung der Fotos ist in Abbildung 15 zu sehen. Aufgrund der beobachteten Ergebnisse wurde für die weiteren Versuche eine Selektionskonzentration von 400  $\mu\text{g/ml}$  verwendet.

#### **4.8 Generierung stabiler HL-1 Zellen**

In stabilen Zelllinien wird ein gewünschtes DNA-Konstrukt (Plasmid) durch Transfektion ins Genom integriert. Dabei wird ein linearisiertes Plasmid transfiziert, welches eine höhere Wahrscheinlichkeit zum Einbau ins Genom besitzt. Der Vorteil gegenüber transienten Transfektion ist die stabile Expression des eingebrachten Konstruktes. Ein Nachteil ist die geringere Ausbeute an exprimierenden Zellen. Die geringere Effizienz ist durch die Notwendigkeit des Einbaus im aktiven Teil des Genoms und eine allgemein geringere Transfektionseffizienz durch die Linearisierung des Plasmids zu erklären. Eine weitere Folge der Linearisierung ist die Bildung von Concatemeren, weshalb man oft mehrere aneinandergereihte Kopien vom Konstrukt im Genom findet.

Durch Verwendung eines Selektionsmarkers oder eines fluoreszierenden Reportergens können positive Zellen in der Kultur angereichert werden, um letztendlich eine Kultur von ausschließlich positiven Zellen zu erhalten. Ein

---

geeigneter Selektionsmarker ist z.B. die Aminoglykosid-Phosphotransferase, welche der Zelle eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Geneticin (G418) verleiht. Durch Kultivierung der Zellen mit dem entsprechenden Selektionsmedium reichert man die positiven Zellen in der Kultur an. Bei der Verwendung eines Reportergens zur Anreicherung der positiven Zellen benötigt man ein *fluorescent activated cell sorting*- (FACS)-Gerät. Mit Hilfe der FACS-Technologie können Zellen mit aktivem Reportergen von nicht exprimierenden Zellen getrennt werden. Ein geeignetes Reportergen ist z.B. das *green fluorescence protein* (GFP). Im Idealfall kombiniert man beide Methoden zur Anreicherung von positiven Zellen.

Zur Generierung von stabilen HL-1 Zellen wurde ein pIRES-Vektor verwendet. In dem Vektor wurde vor die *Internal Ribosome Entry Site* (IRES) humanes *DPF3/1* bzw. *DPF3/2* kloniert und hinter die IRES ein *EGFP*. Außerdem befand sich auf dem Vektor eine Aminoglykosid-Phosphotransferase. Das fertige Konstrukt wurde zur Überprüfung sequenziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop Fotos gemacht. Sowohl für die stabilen als auch für die transienten Transfektion waren nach 24 Stunden 70 – 80 % der Zellen tot. Von den lebenden Zellen fluoreszierten weniger als 5 % der Zellen und von den toten Zellen gaben die meisten ein Fluoreszenzsignal von sich (siehe Abbildung 16). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion für zwei Wochen mit selektiven Medium (400 µg/ml G418) kultiviert. Nach zwei Wochen waren alle Zellen abgestorben.

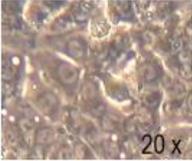
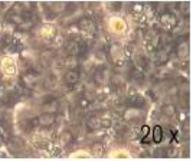
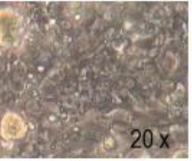
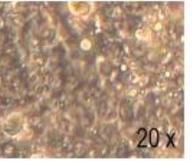
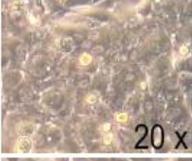
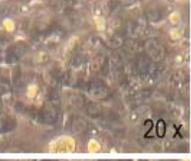
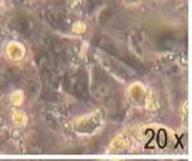
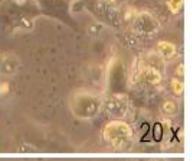
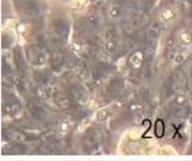
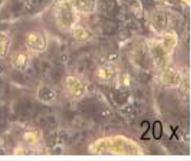
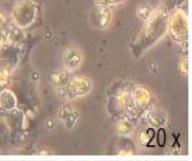
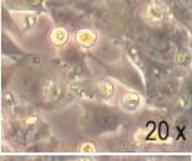
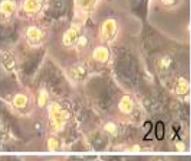
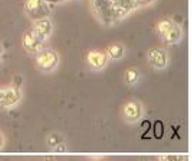
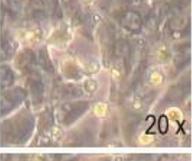
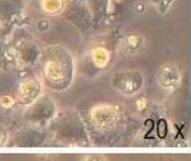
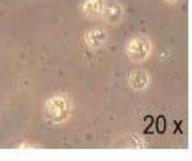
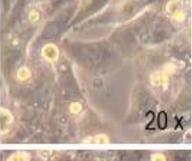
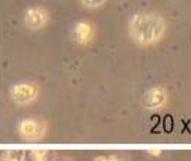
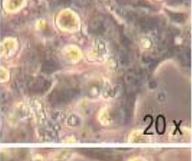
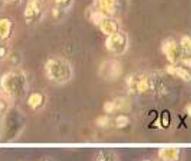
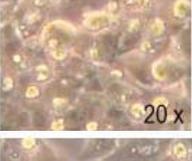
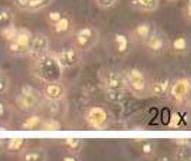
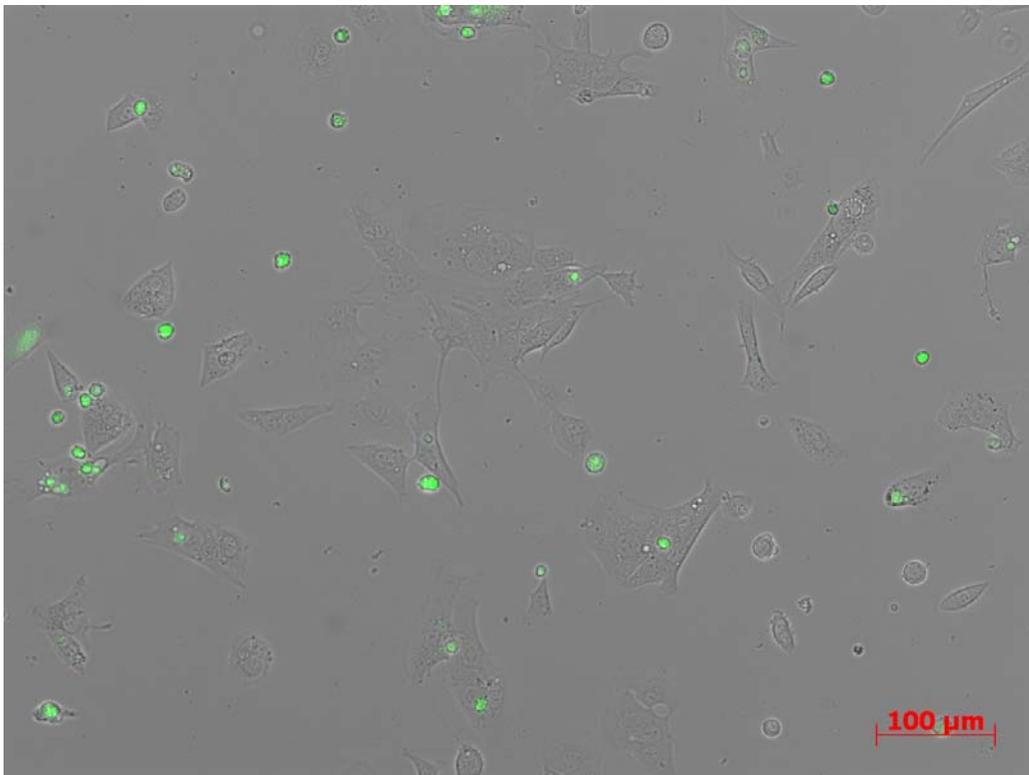
Konzentration von G418 in µg/ml	Zeitpunkte			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0 (Negativ Kontrolle)				
100				
200				
300				
400				
500				
600				
800				
1000				

Abbildung 15: G418 Dosiskurve in HL-1 Zellen. Fotos von allen Konzentrationen zu jedem Zeitpunkt.



**Abbildung 16:** HL-1 Zellen transfiziert mit Amara pIRES-EGFP3-Dpf3/1-5 nach 24 Stunden.

## 5 Diskussion

Im Rahmen der vorgelegten Diplomarbeit sollten potentielle Zielgene des Transkriptionsfaktors Dpf3/1 identifiziert werden. Dpf3/1 ist während der Herzentwicklung exprimiert (Kaynak, 2005) und in Patienten mit TOF verstärkt exprimiert (Kaynak *et al.*, 2003). Dies läßt auf eine Rolle von Dpf3/1 in der Herzentwicklung schließen. In der murinen Kardiomyozyten Zelllinie (HL-1) wurde ein RNAi vermittelter Abbau von Dpf3/1 erreicht und anschließend eine Auswahl an Kandidatengenen via Real-Time qPCR auf differentielle Expression hin untersucht. Zur Erreichung des Ziels musste zuerst die Transfektion der HL-1 Zellen etabliert werden.

### 5.1 Etablierung der Transfektion von siRNA in HL-1 Zellen

Bei Ausführung eines RNAi-Experiments mit exogen eingeführten siRNAs, besteht zuerst die Notwendigkeit einer etablierten Transfektionsmethode. Die Effizienz sollte dabei einen Wert von über 80 % besitzen und die eingesetzte Konzentration von siRNAs minimiert werden (Huppi *et al.*, 2005). Bei einer geringeren Effizienz würde der hinzukommende Verdünnungsfaktor die Messung möglicher Effekte erschweren und bei einer zu hohen Konzentration besteht die Gefahr von unspezifischer mRNA Degradierung. Zur Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen kann eine Testreihe mit einem Fluoreszenz markierten RNA-Oligo durchgeführt werden. Allerdings sollte die benutzte Methode durch Messung eines RNAi Experiments verifiziert werden (Huppi *et al.*, 2005).

Bei der durchgeführten Testreihe (vgl. Kapitel 4.1) war die beobachtete Toxizität bei den Reagenzien Lipofectamine2000 mit PlusReagenz und

GeneSilencer eindeutig zu hoch. Für X-tremeGENE mit einer Konzentration von 40 nM war zwar eine akzeptable Toxizität zu beobachten, allerdings war die Effizienz zu gering. Die beste Kombination für HL-1 Zellen aus geringer Toxizität und hoher Effizienz wurde nach 48 Stunden beim Reagenz X-tremeGENE mit einer Konzentration von 80 nM beobachtet. Folglich wurde zur Ausführung des RNAi Experiments in HL-1 Zellen X-tremeGENE und eine siRNA Konzentration von 80 nM verwendet. Es war von 24 zu 48 Stunden eine Verschiebung von der Kategorie „Pünktchen“ zu wirklich transfizierten Zellen zu beobachten. Daraus wird ersichtlich, dass das Einschleusen der siRNA in die Zelle bis zu 48 Stunden dauert. Aus diesem Grund wurde die Inkubationszeit auf 72 Stunden festgelegt, um einen ausreichenden Zeitraum zwischen Einschleusen der siRNA und Ernten der Zellen zu haben.

## 5.2 RNAi vermittelter Dpf3/1 Abbau in HL-1 Zellen

Bei einem RNAi-Experiment ist neben einer guten Transfektionseffizienz vor allem das Design der verwendeten siRNAs von großer Bedeutung. Die Größe, chemische Modifikationen und die Sequenz spielen dabei eine Rolle. Die Größe sollte in Säugetierzellen kleiner als 30 Basenpaare sein, wodurch eine Pkr spezifische Interferon-Antwort vermieden werden kann (Elbashir *et al.*, 2001b, Caplen *et al.*, 2001). In neueren Studien wurde jedoch gezeigt, dass siRNA mit einer Größe zwischen 21 und 25 Basenpaaren zu einer Pkr spezifischen Interferon-Antwort führen kann (Sledz *et al.*, 2003). Des Weiteren wurde die Aktivierung von Pkr unabhängigen Signalwegen, welche zu Expressionsveränderungen von unspezifischen Genen führen, gezeigt (Persengiev *et al.*, 2004). Die Aktivierung dieser Signalwege ist abhängig von der verwendeten siRNA-Konzentration, wobei die Wahrscheinlichkeit einer Aktivierung mit sinkender Konzentration fällt (Sledz *et al.*, 2003, Persengiev *et al.*, 2004). Experimente mit 27-nt-dsRNA im Vergleich zu 21-nt-siRNA zeigten ein höheres RNAi-Potential für die 27-nt-dsRNA. Die Notwendigkeit der Prozessierung der 27-nt-dsRNA, mit Hilfe des Dicer-Enzyms, in funktionelle

21-nt-siRNA mit einer 5'-Phosphatgruppe und einem 2-nt-3'-Überhang, erhöht vermutlich die Wahrscheinlichkeit der RISC Inkorporation (Sontheimer, 2005). Die verwendete Sequenz entscheidet zum einen über die Zielspezifität und zum anderen über die Wahrscheinlichkeit, welcher Strang der siRNA in den RISC inkorporiert wird (vgl. Kapitel 2.3.2).

Die in diesem Versuch verwendeten Stealth siRNAs besitzen chemische Modifikationen, wodurch die oben beschriebenen Stresssignalwege nicht aktiviert werden sollen. Darüber hinaus führen sie zu einer erhöhten Zielspezifität und Stabilität im Serum (Edenson, 2004). Das Design der Sequenz wurde mit Hilfe des BLOCK IT RNAi Designer Programms von Invitrogen ausgeführt, welches auf der Verwendung des Stealth-Logarithmus basiert. Es wird versichert, dass die Sequenz keine Homologien zu anderen Genen besitzt und dass mit hoher Wahrscheinlichkeit der nicht kodierende Strang in den RISC inkorporiert wird.

Bei der Durchführung eines RNAi-Experiments ist die Verwendung einer geeigneten Negativ Kontrolle sehr wichtig. Zur Berücksichtigung möglicher zytotoxischer Effekte, ausgelöst durch den Transfektionsreagenz-siRNA-Komplex, ist es essentiell die gleiche Menge an Transfektionsreagenz mit einer negativen siRNA, die keine Sequenzhomologie zum Mausgenom hat, zu verwenden. Ein zweiter Grund zur Verwendung einer negativen siRNA als Kontrolle, ist die Möglichkeit zu berücksichtigen, dass die exogen eingeführte siRNA, die RNAi-Maschinerie in der Zelle übersättigt und somit die endogenen siRNAs, zur Regulation der Expression, nicht mehr prozessiert werden können. Beim Design einer geeigneten negativen siRNA ist vor allem auf fehlende Homologie zum Genom und auf einen ähnlichen G/C-Gehalt, zu den verwendeten siRNAs, zu achten (Huppi *et al.*, 2005). Als Negativ Kontrolle diente in dieser Arbeit eine siRNA, welche keine Homologien zum Mausgenom besitzt und den gleichen G/C-Gehalt, wie die verwendeten siRNAs, besitzt. Der Nachweis eines RNAi-Experiments sollte auf RNA- und auf Proteinebene erfolgen. Mittels der Real-Time qPCR kann die Degradierung der mRNA quantifiziert werden, dabei sollten im Idealfall Primer benutzt werden, welche die Bindungsstelle der siRNA flankieren (Huppi *et al.*, 2005). Der zusätzliche Nachweis auf Proteinebene kann mit einem Western-Blot mit anschließendem Antikörpernachweis erfolgen. Zur Verifizierung der

beobachteten Ergebnisse sollten mindestens zwei verschiedene siRNAs benutzt werden, welche an unterschiedliche Stellen im Transkript binden (Huppi *et al.*, 2005).

Zum RNAi vermittelten Abbau von Dpf3/1 in HL-1 Zellen wurden zwei verschiedene Stealth siRNAs von Invitrogen benutzt, mit unterschiedlichen Bindestellen im Transkript. Für die beiden siRNAs wurde der gleiche Grad an mRNA Degradierung erreicht, welches für einen spezifischen Effekt der siRNA spricht. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass die Primer, welche jeweils die Bindestellen der einzelnen siRNAs flankieren, den höchsten Grad der Degradierung für die jeweiligen siRNAs messen. Der Primer Dpf3/1-2 flankiert die Bindestelle von siRNA-962 und Dpf3/1-3 die Bindestelle von siRNA-1115 (siehe Abbildung 8). Die Differenz für den Primer Dpf3/1-1 lässt sich ebenfalls durch die nähere Lokalisation des Primers zur Bindestelle der siRNA-1115 erklären.

Auf Grund eines nicht existenten Antikörper gegen Dpf3 wurde in dieser Arbeit der Nachweis nur auf der RNA-Ebene vollzogen.

### **5.3 Effekte des RNAi vermittelten Abbaus von Dpf3/1 in HL-1 Zellen**

Bei der Messung möglicher Zielgene von Dpf3/1, in HL-1 Zellen mit einem RNAi vermittelten Abbau von Dpf3/1, wurde eine generelle Reduktion der mRNA Menge gemessen (siehe Abbildungen 11 bis 14 ). Für einen spezifischen Effekt durch den RNAi vermittelten Abbau von Dpf3/1 spricht die Tatsache, dass für beide verwendeten siRNAs der gleiche Effekt gemessen wurde. Durch die Verwendung unterschiedlicher Sequenzen der siRNAs würde man bei einer unspezifischen Degradierung der mRNA, für die einzelnen siRNAs, voneinander abweichende Ergebnisse erwarten (Jackson *et al.*, 2003). Gegen eine allgemeine Degradierung im Zuge einer Interferon-Antwort spricht die Tatsache, dass die gemessenen ISG keine verstärkte

Expression in den Proben zeigten (siehe Abbildung 10) (Sledz *et al.*, 2003). Eine veränderte Expression auf Grund eines Pkr unabhängigen Stresssignalweges ist ebenfalls unwahrscheinlich, weil eine siRNA ohne Sequenzhomologie diesen Signalweg ebenfalls aktiviert (Persengiev *et al.*, 2004). Es sollten also für die Negativ Kontrolle und die spezifischen siRNAs gegen *Dpf3/1* die gleichen Veränderungen zu beobachten sein. Des Weiteren sollte durch die Benutzung von Stealth siRNAs keine Stresssignalwege in der Zelle ausgelöst werden (Edenson, 2004).

In den Messungen ist eine Reduktion der mRNA von *Dpf3/2* zu sehen, was auf eine autoregulatorische Funktion von *Dpf3/1* schließen lässt. Die RNAi vermittelte Verminderung der *Dpf3/1* und *Dpf3/2* Expression könnte eine Erklärung der beobachteten Effekte darstellen. Beide Isoformen stellen mit ihren Domänen potentielle Proteine der Genregulation dar. Beide besitzen einen C2H2-Zinkfinger und PHD-Finger, welcher allerdings in der Isoform *Dpf3/1* unvollständig ist. Der C2H2-Zinkfinger ermöglicht DNA-Interaktionen und der PHD-Finger stellt einen potentiellen Chromatin modulierenden Faktor dar (vgl. Kapitel 2.1). Durch die Reduktion eines möglichen Chromatin modulierenden Faktors ließe sich die generell beobachtete Reduktion der Expression erklären.

Zur Normalisierung der erhaltenen Ergebnisse wurden in den siRNA behandelten Zellen mehrere Haushaltsgene gemessen (siehe Abbildung 9). Die verschiedenen Haushaltsgene wiesen unterschiedlich starke Level an mRNA Reduktion im Vergleich zur Negativ Kontrolle auf. Diese Variation lässt ebenfalls auf eine Regulation schließen, weshalb sie nicht zur Normalisierung verwendet werden konnten.

Die generelle Reduktion von allen getesteten Genen könnte allerdings auch durch unspezifische Effekte ausgelöst sein. Ein genereller Unterschied in den cDNA-Konzentrationen der einzelnen Proben ist auszuschließen, weil die Unterschiede zwischen den einzelnen Genen stark variieren.

## 5.4 Generierung stabiler HL-1 Zellen

Die beobachtete Toxizität bei den HL-1 Zellen ist wahrscheinlich auf eine Kombination aus Transfektion und Expression des pIRES-GFP-Plasmid zurückzuführen. Der Hauptteil der toten Zellen zeigt ein Fluoreszenzsignal, was auf eine Expression des Konstruktes schließen lässt. Eine Autofluoreszenz ist dabei auszuschließen, weil nicht alle toten Zellen dieses Signal emittierten. Ein Unterschied zwischen den einzelnen Konstrukten war nicht zu erkennen. Vermutlich erzeugte die Transfektion und die anschließende transgene Expression derartigen Stress, dass die meisten transfizierten Zellen die Apoptose einleiteten. Aus diesem Grund ist die beobachtete Transfektionseffizienz unter 5 %, weil die meisten transfizierten Zellen abgestorben sind. Bei der anschließenden G418-Selektion starben zunächst die untransfizierten Zellen, wodurch die Zelldichte rapide abnahm. Die verbleibenden transfizierten HL-1 Zellen starben vermutlich auf Grund der zu geringen Zelldichte. Die HL-1 Zellen wachsen bevorzugt in einer konfluenten Kultur.

## 5.5 Ausblick

Zur Verifizierung der beobachteten Ergebnisse sollten folgende Ansätze durchgeführt werden:

- Eine Testreihe zur Ermittlung der geringsten siRNA-Konzentration, welche einen entsprechenden Grad der Dpf3/1 Degradierung in HL-1 Zellen hervorruft. Mit dieser Konzentration sollte das Experiment wiederholt und auf gleiche Ergebnisse hin untersucht werden. Durch Minimierung der eingesetzten siRNA-Konzentration kann die Wahrscheinlichkeit von unspezifischen Effekten der siRNA verringert werden.

- Anschließend kann zum Ausschluß von unspezifischen Effekten ein Rettungsexperiment durchgeführt werden. Dabei wird die siRNA mit einer siRNA resistenten cDNA kotransfiziert und somit versucht den beobachteten Phänotyp zu retten. Dies kann durch Verwendung eines orthologen Transgens, welches sich nur auf der Nukleotidebene unterscheidet oder durch Verwendung einer siRNA, welche in der 5' bzw. 3' untranslatierten Region bindet, erreicht werden.

Als weiterführende Experimente kann die etablierte RNAi vermittelte Reduktion von *Dpf3/1* für einen Microarray benutzt werden und somit weiter Zielgene von *Dpf3/1* identifiziert werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob es sich bei *Dpf3/1* und *Dpf3/2* um Transkriptionsfaktoren und/oder Chromatin modulierende Faktoren handelt und dadurch die beobachteten Effekte zu erklären sind.

## 6 Zusammenfassung

In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass *Dpf3/1* im Ventrikel, im Atrium und im Einfluss- und Ausflusstrakt des Herzens von Mäuse- und Hühnerembryonen exprimiert wird (Kaynak, 2005). Des Weiteren wurde eine verstärkte Expression von *Dpf3/1* in Herzproben von Patienten mit TOF im Vergleich zu gesunden Herzen nachgewiesen (Kaynak *et al.*, 2003). Diese Erkenntnisse weisen auf eine Rolle von *Dpf3/1* in der Herzentwicklung hin. Auf Grund der Domänenorganisation von *Dpf3/1*, agiert vermutlich *Dpf3/1* als Transkriptionsfaktor in der Herzentwicklung.

In dieser Arbeit sollten Zielgene von *Dpf3/1* identifiziert werden. Zur Erreichung der Ziele wurde in einer murinen Kardiomyozyten Zelllinie mit Hilfe der RNAi-Technologie die *Dpf3/1* mRNA degradiert und versucht eine stabile Zelllinie zu etablieren, in welcher die Expression von *Dpf3/1* verstärkt ist. Anschließend wurde mit Hilfe von Real-Time qPCR die Expression möglicher Zielgene analysiert.

Zuerst wurde die Transfektion der murinen Kardiomyozyten Zelllinie HL-1 etabliert. Für die Transfektion von siRNAs wurde X-tremeGENE verwendet und für Plasmid die Amaxa-Technologie. Zur Bestimmung einer geeigneten Selektionskonzentration für HL-1 Zellen wurde eine G418 Dosiskurve angefertigt. Für die Erstellung einer stabilen Zelllinie wurde in einen pIRES-Vektor *DPF3/1* bzw. *DPF3/2* und durch die IRES getrennt ein *EGFP* kloniert. Die anschließende Transfektion und Expression des Plasmids wirkte sich toxisch auf die HL-1 Zellen aus, so dass letztendlich alle Zellen starben.

Mit Hilfe der RNAi-Technologie wurde mit zwei verschiedenen siRNAs gegen *Dpf3/1* jeweils eine Reduktion des *Dpf3/1* mRNA Levels von 90 % erreicht. Die weitere Analyse zeigte ebenfalls eine Reduktion der *Dpf3/2* mRNA, welches auf eine autoregulatorische Funktion von *Dpf3/1* schließen lässt. Alle weiteren getesteten möglichen Zielgene von *Dpf3/1* zeigten eine unterschiedlich starke Reduktion der mRNA Levels. Bei allen getesteten Genen wurde für beide eingesetzten siRNAs der gleiche Grad an mRNA

Reduktion festgestellt. Diese Tatsache und eine ausbleibende Interferon-Antwort impliziert, dass die beobachteten Ergebnisse spezifisch durch die Reduktion von Dpf3/1 verursacht wurden.

---

## **Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
<i>al.</i>	<i>alli</i>
Ago	Argonaute
ASD	Atrialeptumdefekt
ATP	Adenosintriophosphat
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Celsius
CHD	<i>congenital heart disease</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dpf3	<i>D4, zinc and double PHD fingers, family 3</i>
dsRNA	<i>double strand</i> Ribonukleinsäure
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G	Guanin
g	Schleuderziffer
G418	Geneticin
h	Stunden
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
ISG	Interferon stimulierte Gene
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
M	Mol
ml	Milliliter
mM	Millimol
min	Minuten
miRNA	<i>micro</i> Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NLS	Nukleus Lokalisation Signal
ng	Nanogramm
nM	Nanomol
nm	Nanometer

---

nt	Nukleotide
PAZ	PIWI-Argonaute-Zwille
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PHD	<i>plant homeodomain</i>
Pkr	dsRNA abhängige Proteinkinase
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
راسRNA	<i>repeat associated short interfering</i> Ribonukleinsäure
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RITS	<i>RNA induced transcriptional gene silencing</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	Ribonukleinsäure Interferenz
RVOT	<i>right ventricular outflow tract</i>
Sek	Sekunden
siRNA	<i>short interfering</i> Ribonukleinsäure
T	Thymin
TOF	<i>Tetralogy of Fallot</i>
U	<i>Units</i>
VSD	Ventrikelseptumdefekt
μg	Microgramm
μl	Microliter
μM	Micromol

---

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: PHD-Finger von BPTF. Die Aminosäuren des konservierten Cystein <sub>4</sub> -Histidin-Cystein <sub>3</sub> Motivs sind grün unterlegt und die Aminosäuren zur Ausbildung des aromatische Käfigs sind violettrot unterlegt. Die blau und hellgrün unterlegten Aminosäuren dienen zur Bindung vom Histon3. $\alpha$ zeigt eine $\alpha$ -Helix und $\beta$ eine $\beta$ -Faltblattstruktur an. (Modifiziert nach Li <i>et al.</i> , 2006) .....	10
Abbildung 2: Proteinstruktur von Dpf3/1 und Dpf3/2. C2H2 steht für ein C2H2-Zinkfinger und PHD für einen PHD-Finger .....	11
Abbildung 3: Modell der RNA Interferenz. Primäre miRNA wird durch Drosch prozessiert und über Exportin-5 ins Zytoplasma transportiert. Dort wird es von Dicer in siRNA prozessiert und in miRNP/RISC eingebaut. Anschließend inhibiert oder spaltet sie die Ziel-mRNA. Exogene dsRNA wird durch Dicer in siRNA prozessiert, in RISC eingebaut und verursacht die Spaltung der Ziel-mRNA. (Modifiziert nach Meister <i>et al.</i> , 2004) .....	15
Abbildung 4: Agarosegel des Mykoplasmentests. M: 100Bp DNA Ladder; 1: Negativ Kontrolle; 2: HL-1 Zellen; 3: HL-1 Zellen; 4: HEK293 Zellen; 5: C2C12 Zellen; 6: Positiv Kontrolle.....	36
Abbildung 5: Dissoziationskurve des Primers 1810007M14Rik_m_f4/r4. ....	41
Abbildung 6: HL-1 Zellen transfiziert mit X-tremeGENE 80 nM FITC nach 48 Stunden. ....	50
Abbildung 7: C2C12 Zellen transfiziert mit X-tremeGENE 40 nM FITC nach 48 Stunden .....	51
Abbildung 8: Dpf3 mRNA Levels in siRNA behandelten HL-1 Zellen. Dargestellt sind die entlogarithmierten Mittelwerte im Vergleich zur Negativ Kontrolle + Standardabweichung für Dpf3 allgemein, Dpf3/1 und Dpf3/2. ....	53
Abbildung 9: mRNA Levels einzelner Haushaltsgene in siRNA behandelten HL-1 Zellen. Dargestellt sind die entlogarithmierten Mittelwerte im Vergleich zur Negativ Kontrolle + Standardabweichung .....	53
Abbildung 10: mRNA Levels der beiden ISGs in siRNA behandelten HL-1 Zellen. Dargestellt sind die entlogarithmierten Mittelwerte im Vergleich zur Negativ Kontrolle + Standardabweichung .....	55
Abbildung 11: mRNA Levels einzelner Transkriptionsfaktoren in siRNA behandelten HL-1 Zellen. Dargestellt sind die entlogarithmierten Mittelwerte im Vergleich zur Negativ Kontrolle + Standardabweichung. ....	57
Abbildung 12: mRNA Levels einzelner Gene des Cytoskeletts in siRNA behandelten HL-1 Zellen. Dargestellt sind die entlogarithmierten Mittelwerte im Vergleich zur Negativ Kontrolle + Standardabweichung. ....	58
Abbildung 13: mRNA Levels einzelner Signalproteine in siRNA behandelten HL-1 Zellen. Dargestellt sind die entlogarithmierten Mittelwerte im Vergleich zur Negativ Kontrolle + Standardabweichung .....	58
Abbildung 14: mRNA Levels von Genen aus der Gruppe Dpf3/1 assoziierte Gene in siRNA behandelten HL-1 Zellen. Dargestellt sind die entlogarithmierten Mittelwerte im Vergleich zur Negativ Kontrolle + Standardabweichung .....	59
Abbildung 15: G418 Dosiskurve in HL-1 Zellen. Fotos von allen Konzentrationen zu jeden Zeitpunkt.....	63
Abbildung 16: HL-1 Zellen transfiziert mit Amara pIRES-EGFP3-Dpf3/1-5 nach 24 Stunden. ....	64

---

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten siRNAs gegen Dpf3/1.....	23
Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten RealTime-qPCR Primer.....	24
Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Klonierungsprimer. ....	27
Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten Sequenzierungsprimer. ....	27
Tabelle 5: Toxizität der einzelnen Transfektionsreagenzien bei HL-1 Zellen. Es ist der prozentuale Anteil und die absolute Zahl von toten Zellen zur Gesamtzellzahl angegeben. Des Weiteren ist die Zahl lebender Zellen pro mm <sup>2</sup> aufgeführt. ....	49
Tabelle 6: Transfektionseffizienzen der einzelnen Transfektionsreagenzien bei HL-1 nach 24 Stunden. Es sind die prozentualen Anteile der Kategorien „Effizienz“ und „Pünktchen“, die Zahl lebender Zellen pro mm <sup>2</sup> und die Gesamtzahl lebender Zellen aufgeführt. ....	49
Tabelle 7: Transfektionseffizienzen der einzelnen Transfektionsreagenzien bei HL-1 nach 48 Stunden. Es sind die prozentualen Anteile der Kategorien „Effizienz“ und „Pünktchen“, die Zahl lebender Zellen pro mm <sup>2</sup> und die Gesamtzahl lebender Zellen aufgeführt. ....	49
Tabelle 8: Toxizität der einzelnen Transfektionsreagenzien bei C2C12 Zellen. Es ist der prozentuale Anteil und die absolute Zahl von toten Zellen zur Gesamtzellzahl angegeben. Des Weiteren ist die lebende Zellzahl pro mm <sup>2</sup> aufgeführt. ....	50
Tabelle 9: Transfektionseffizienzen der einzelnen Transfektionsreagenzien bei C2C12 nach 24 Stunden. Es sind die prozentualen Anteile der Kategorien „Effizienz“ und „Pünktchen“, die Zahl lebender Zellen pro mm <sup>2</sup> und die Gesamtzahl lebender Zellen aufgeführt. ....	51
Tabelle 10: Transfektionseffizienzen der einzelnen Transfektionsreagenzien bei C2C12 nach 48 Stunden. Es sind die prozentualen Anteile der Kategorien „Effizienz“ und „Pünktchen“, die Zahl lebender Zellen pro mm <sup>2</sup> und die Gesamtzahl lebender Zellen aufgeführt. ....	51
Tabelle 11: Beschreibung der verwendeten ISGs.....	54
Tabelle 12: Liste möglicher Zielgene von Dpf3/1. ....	56
Tabelle 13: Transfektionseffizienzen von Plasmid in HL-1 Zellen mit verschiedenen Amaxa-Programmen.....	60

---

## **Literaturverzeichnis**

**Aasland R., Gibson T. J. and Stewart A. F.**, The PHD finger: Implications for chromatin-mediated transcriptional regulation, 1995, Trends in Biochemical Sciences, 20,(2), 56-59,

**Ambros V.**, The functions of animal microRNAs, 2004, Nature, 431,(7006), 350-355,

**Aronin N.**, Target selectivity in mRNA silencing, 2006, Gene Therapy, 13,(6), 509-516,

**Bienz M.**, The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain, 2006, Trends in Biochemical Sciences  
CELEBRATING 30 YEARS OF TiBS, 31,(1), 35-40,

**Buchman V. L., Ninkina N. N., Bogdanov Y. D., Bortvin A. L., Akopian H. N., Kiselev S. L., Krylova O., Anokhin K. V. and Georgiev G. P.**, Differential splicing creates a diversity of transcripts from a neurospecific developmentally regulated gene encoding a protein with new zinc-finger motifs, 1992, Nucleic Acids Res, 20,(21), 5579-85,

**Buckingham M., Meilhac S. and Zaffran S.**, BUILDING THE MAMMALIAN HEART FROM TWO SOURCES OF MYOCARDIAL CELLS, 2005, Nature Reviews Genetics  
Nat Rev Genet, 6,(11), 826-837,

**Caplen N., Parrish S., Imani F., Fire A. and R. M.**, Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems, 2001, Proc Natl Acad Sci, 98,(17), 9742-9747,

**Chestkov A. V., Baka I. D., Kost M. V., Georgiev G. P. and Buchman V. L.**, The d4 Gene Family in the Human Genome, 1996, Genomics, 36,(1), 174-177,

**Claycomb W. C., Lanson N. A., Jr., Stallworth B. S., Egeland D. B., Delcarpio J. B., Bahinski A. and Izzo N. J., Jr.**, HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte  
10.1073/pnas.95.6.2979, 1998, PNAS, 95,(6), 2979-2984,

**Denli A. M. and Hannon G. J.**, RNAi: an ever-growing puzzle, 2003, Trends in Biochemical Sciences, 28,(4), 196-201,

**Edenson S.**, Stealth RNAi: The Next Generation, 2004, Quest, 1,(1), 34-36

**Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K. and Tuschl T.**, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, 2001b, Nature, 411,(6836), 494-498,

---

**Elbashir S. M., Lendeckel W. and Tuschl T.**, RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs  
10.1101/gad.862301, 2001, *Genes Dev.*, 15,(2), 188-200,

**EMBL-EBI**, August 2006, [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-id+ppW81TDKJs+-e+\[INTERPRO:IPR000690\]](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-id+ppW81TDKJs+-e+[INTERPRO:IPR000690])

**Fire A., Albertson D., Harrison S. and Moerman D.**, Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle., 1991, *Development*, 113,(2), 503-514,

**Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E. and Mello C. C.**, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, 1998, *Nature*, 391,(6669), 806-811,

**Gabig T., Mantel P., Rosli R. and Crean C.**, Requiem: a novel zinc finger gene essential for apoptosis in myeloid cells, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269,(47), 29515-29519,

**Guo S. and Kemphues K. J.**, par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed, 1995, *Cell*, 81,(4), 611-620,

**Hannon G. J.**, RNA interference, 2002, *Nature*, 418,(6894), 244-251,

**Huppi K., Martin S. E. and Caplen N. J.**, Defining and Assaying RNAi in Mammalian Cells, 2005, *Molecular Cell*, 17,(1), 1-10,

**Jackson A. L., Bartz S. R., Schelter J., Kobayashi S. V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G. and Linsley P. S.**, Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi, 2003, *Nat Biotech*, 21,(6), 635-637,

**Kaynak B.**, Global transcriptome and spatio-temporal gene expression analysis of normal and malformed hearts, 2005, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Freie Universität Berlin

**Kaynak B., von Heydebreck A., Mebus S., Seelow D., Hennig S., Vogel J., Sperling H.-P., Pregla R., Alexi-Meskishvili V., Hetzer R., Lange P. E., Vingron M., Lehrach H. and Sperling S.**, Genome-Wide Array Analysis of Normal and Malformed Human Hearts, 2003, *Circulation*, 107,(19), 2467-2474,

**Li H., Ilin S., Wang W., Duncan E. M., Wysocka J., Allis C. D. and Patel D. J.**, Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF, 2006, *Nature*, 442,(7098), 91-95,

**Lippman Z. and Martienssen R.**, The role of RNA interference in heterochromatic silencing, 2004, *Nature*, 431,(7006), 364-370,

---

**Meister G. and Tuschl T.**, Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA, 2004, *Nature*, 431,(7006), 343-349,

**Ninkina N. N., Mertsalov I. B., Kulikova D. A., Alimova-Kost M. V., Simonova O. B., Korochkin L. I., Kiselev S. L. and Buchman V. L.**, Cerd4, third member of the d4 gene family: expression and organization of genomic locus, 2001, *Mammalian Genome*, 12,(11), 862-866,

**Packham E. A. and Brook J. D.**, T-box genes in human disorders 10.1093/hmg/ddg077, 2003, *Hum. Mol. Genet.*, 12,(suppl\_1), R37-44,

**Park M. K.**, *The Pediatric Cardiology, Handbook*, 1997, Second Edition, Mosby, St Louis, 0-8151-9005-0

**Pena P. V., Davrazou F., Shi X., Walter K. L., Verkhusha V. V., Gozani O., Zhao R. and Kutateladze T. G.**, Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2, 2006, *Nature*, 442,(7098), 100-103,

**Persengiev S., Zhu X. and Green M.**, Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs), 2004, *RNA*, 10,(1), 12-18,

**Sadler T.**, *Medizinische Embryologie*, 1998, 9, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3-13-446609-0

**Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K. and Erlich H.**, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, 1988, *Science*, 239,(4839), 487-491,

**Schindler U., Beckmann H. and Cashmore A. R.**, HAT3.1, a novel Arabidopsis homeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region, 1993, *Plant J*, 4,(1), 137-50,

**Shi X., Hong T., Walter K. L., Ewalt M., Michishita E., Hung T., Carney D., Pena P., Lan F., Kaadige M. R., Lacoste N., Cayrou C., Davrazou F., Saha A., Cairns B. R., Ayer D. E., Kutateladze T. G., Shi Y., Cote J., Chua K. F. and Gozani O.**, ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression, 2006, *Nature*, 442,(7098), 96-99,

**Sledz C. A., Holko M., de Veer M. J., Silverman R. H. and Williams B. R. G.**, Activation of the interferon system by short-interfering RNAs, 2003, 5,(9), 834-839,

**Sontheimer E. J.**, ASSEMBLY AND FUNCTION OF RNA SILENCING COMPLEXES, 2005, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6,(2), 127-138,

**Waterhouse P. M., Wang M.-B. and Lough T.**, Gene silencing as an adaptive defence against viruses, 2001, *Nature*, 411,(6839), 834-842,

---

**Williams B. R.**, Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation, 1997, Biochemical Society Transactions, 25,(509-513,

**Wysocka J., Swigut T., Xiao H., Milne T. A., Kwon S. Y., Landry J., Kauer M., Tackett A. J., Chait B. T., Badenhorst P., Wu C. and Allis C. D.**, A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling, 2006, Nature, 442,(7098), 86-90,

**Yaffe D. and Saxel O.**, Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle, 1977, Nature, 270,(5639), 725-727,

**Zamore P. D.**, RNA interference: listening to the sound of silence, 2001, Nat Struct Mol Biol, 8,(9), 746-750,

**Zhang H., Kolb F. A., Brondani V., Billy E. and Filipowicz W.**, Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP, 2002, EMBO Journal, 21,(21), 5875-5885,

---

### **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre an Eides Statt, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und inhaltliche entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.  
Diese Arbeit hat keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Berlin, 25 August 2006

-----  
(Philip Tomann)