

Aus der Frauenklinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. T. N. Fehm

Funktionelle Charakterisierung von CapG und Identifikation von CapG Zielgenen im Ovarialkarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Johanna Glaser

2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Markus Fleisch
Korreferent: Prof. Dr. med. Nikolas Stoecklein

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Glaser J., Schleithoff C., Seier N., Deenen R., Köhrer K., Fleisch M., Hepp P., Janni W., Niederacher D. Differential regulation of CapG target genes involved in invasiveness of breast and ovarian carcinoma cells. Arch Gynecol Obstet (2010) 282 (Suppl 1): S 52

J. Glaser, M.H.D. Neumann, Qi Mei, B. Betz, N. Seier, I. Beyer, T. Fehm, H. Neubauer, D. Niederacher and M.C. Fleisch Macrophage Capping Protein CapG Is a Putative Oncogene Involved in Migration and Invasiveness in Ovarian Carcinoma Biomed Res Int. 2014; 2014:379847

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Das Ovarialkarzinom	1
1.1.1. Ätiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2. Diagnostik und Therapie	4
1.2. Aktinfilamente und Aktin-bindende Proteine	6
1.3. Im Fokus: CapG	8
1.4. Potenzielle Zielgene von CapG bei Mamma- und Ovarialkarzinom in einer Microarray-Studie	10
1.4.1. Ankyrin 3 (Ank3, Ankyrin-G)	13
1.4.2. Betacellulin (BTC)	13
1.4.3. IGF2	13
1.4.4. RasGRF1	14
1.4.5. STAT4	14
1.4.6. Thymosin β 15b	14
1.5. Zielsetzung	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Molekularbiologische Methoden	17
2.1.1. RNA-Isolierung	17
2.1.2. Quantifizierung von RNA	17
2.1.3. cDNA- Synthese	17
2.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	19
2.1.5. β -Aktin-PCR zur Kontrolle der cDNA-Synthese	19
2.1.6. Quantitative Real-time PCR	20
2.1.7. High Resolution Melting (HRM)	22
2.1.8. Agarose-Gelelektrophorese	24
2.1.9. Tumorproben	24
2.2. Klonierung	25

2.2.1.	Plasmide	25
2.2.2.	Bakterienstämme	25
2.2.3.	Restriktionsanalyse von DNA	26
2.2.4.	Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors	26
2.2.5.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	26
2.2.6.	Ligation	27
2.2.7.	Herstellung elektrokompenter E.coli-Zellen	27
2.2.8.	Elektroporation	27
2.2.9.	Plasmid-Präparation aus E.coli	28
2.3.	Zellbiologische Methoden	28
2.3.1.	Zelllinien und Zellkultur	28
2.3.2.	Bestimmung der Zellzahl	29
2.3.3.	Kryokonservierung	30
2.3.4.	Stabile lentivirale Transfektion	30
2.3.5.	RNA-Interferenz	31
2.3.6.	IGF2 - Stimulation	32
2.4.	Invasionsassay	32
2.4.1.	Matrigel® Invasionsassay (BD Biocoat)	32
2.4.2.	Scratch Assay (Migrationsassay)	34
2.5.	Proteinanalytische Methoden	35
2.5.1.	Herstellung von Gesamtzellextrakten	35
2.5.2.	Subzelluläre Fraktionierung	35
2.5.3.	Proteinbestimmung	36
2.5.4.	SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	37
2.5.5.	Western Blot und immunologische Detektion	38
2.5.6.	Proteinpräzipitation	40
2.5.7.	Zweidimensionale Gelelektrophorese	40
2.5.8.	Immunzytochemie	41
3.	Ergebnisse	43
3.1.	CapG wird im Ovarialkarzinom überexprimiert	43
3.2.	CapG-Expression in den Ovarialkarzinom-Zelllinien SK-OV-3 und Hey	44
3.3.	Invasivität der Ovarialkarzinom-Zelllinien SK-OV-3 und Hey	45

3.4.	Modulation der CapG-Expression	46
3.5.	Einfluss der CapG-Expression auf das Invasions- und Migrationsverhalten	47
3.5.1.	CapG beeinflusst das Migrationsverhalten	47
3.5.2.	CapG-Expression korreliert mit Invasivität	49
3.6.	Unterschiedliche subzelluläre Verteilung von CapG	50
3.7.	Validierung der nukleären Lokalisation bei Hey-Zellen	52
3.8.	Isoelektrische Auftrennung der Varianten von CapG in der Zelllinie Hey	54
3.9.	Die Verteilung der Allele im SNP rs6886 bei Ovarial- und Tubenkarzinom	57
3.10.	Expressionsverteilung von sechs potenziellen CapG-Zielgenen	60
3.11.	IGF2 und Ank3 sind invers zu CapG reguliert	64
3.12.	Ank3 und IGF2 zeigen keine Korrelation zu CapG in Tumorproben	66
3.13.	Expressionsprofile unter IGF2-Stimulation	69
4.	Diskussion	72
4.1.	CapG-Expression korreliert mit Invasionsverhalten	72
4.2.	Subzelluläre Lokalisation von CapG	75
4.3.	Posttranslationale Modifikation	76
4.4.	Histidin-Variante des SNP rs6886 in Ovarial- und Tubenkarzinom erhöht	78
4.5.	Mögliche Interaktion von CapG mit IGF2 und Ank3	81
4.6.	Einfluss von IGF2 auf das Expressionsprofil bei SK-OV-3	85
5.	Zusammenfassung	88
6.	Literatur	90
7.	Tabellenverzeichnis	100
8.	Abbildungsverzeichnis	101
9.	Anhang	103
9.1.	Plasmidkarte	103
9.2.	Eidesstattliche Versicherung	104
9.3.	Danksagung	105

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung	HER-2	<i>human epidermal</i>
ABP	Aktin bindendes Protein	<i>growth</i>	<i>factor receptor</i>
ADP	Adenosindiphosphat	His	Histidin
APS	Ammoniumpersulfat	HRMA	<i>high resolution melting</i>
Arg	Arginin		<i>analysis</i>
ATP	Adenosintriphosphat	IGF2	<i>Insulin growth factor 2</i>
BME	<i>basement membrane</i>	IP	Isoelektrischer Punkt
	<i>extract</i>	IPG	Immobilisierte
BMFZ	Biologisch-medizinisches		pH-Gradienten
	Forschungszentrum	kb	Kilobasen
bp	Basenpaare	kD	Kilodalton
Ca	Karzinom	min	Minute
Ct	<i>cycle threshold</i>	N	Normalprobe
CTP	Cytidintriphosphat	nm	Nanometer
DAPI	Bisbenzimid	OC	Ovarialkarzinom
dH ₂ O	destilliertes Wasser	OT	Objektträger
DMSO	Dimethylsulfoxid	OvCa	Ovarialkarzinom
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PCR	Polymeraseketten-
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		reaktion
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	PBS	<i>phosphate buffered</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor</i>		<i>saline</i>
	<i>receptor</i>	PIP ₂	Phosphatidyl-
FIGO	International Federation		inositol4,5-
	of Gynecology and		bisphosphonate
	Obstetrics	RasGRF1	<i>Ras protein-specific</i>
FSH	Follikel stimulierendes		<i>guanine nucleotide</i>
	Hormon		<i>releasing factor</i>
GDP	Guanosindiphosphat	RKI	Robert-Koch-Institut
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-	RNA	Ribonukleinsäure
	phosphat-	rpm	Rotationen pro Minute
	Dehydrogenase	RT	Raumtemperatur
h	Stunde	SDS	Natriumdodecylsulfat

sec	Sekunde	TBS-T	Tris-gepufferte
siRNA	<i>small interfering RNA</i>		isotonische Salzlösung
SNP	<i>single nucleotide</i>		mit 0,1% Tritron
	<i>polymorphism</i>	TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-
STAT4	<i>signal transducer and</i>		Puffer
	<i>activator of transcription</i>	TCA	Trichloressigsäure
STIC	<i>serous tubal</i>	TEMED	N,N,N',N'-
	<i>intraepithelial carcinoma</i>		Tetramethylethylen-
T	Tumorprobe		diamin

1. Einleitung

1.1. Das Ovarialkarzinom

Mit 3,5% liegt Eierstockkrebs an fünfter Stelle aller Krebsneuerkrankungen der Frau in Deutschland (Stand 2010, RKI). Es liegt damit hinter dem Mammakarzinom, Darmkrebs sowie dem Bronchial- und Gebärmutterkarzinom. Prozentual steht es auch in der Statistik der Krebssterbefälle mit 5,6% an fünfter Stelle. In 2010 erkrankten demnach 7790 Frauen (für das Jahr 2014 sind es voraussichtlich 7500) und 5599 erlagen dem Tumorleiden (RKI, 2010). Das Ovarialkarzinom hat damit die höchste Mortalität unter den gynäkologischen Tumoren.

Im europaweiten Vergleich zeigt sich ein Nord-Süd-Gefälle mit der höchsten Inzidenz in Skandinavien, gefolgt von England, Frankreich, der Schweiz und Deutschland. Die niedrigste Inzidenz findet sich im Mittelmeerraum.

Das Erkrankungsrisiko ist stark vom Alter abhängig, wobei es mit zunehmendem Alter deutlich ansteigt. Während das Risiko einer 40-jährigen Frau in den nächsten 10 Jahren an Eierstockkrebs zu erkranken noch bei 0,1% liegt, liegt es bei einer 70-Jährigen bereits bei 0,5%. Das Lebenszeitrisko einer Frau liegt derzeit bei 1,5%.

1.1.1. Ätiologie und Risikofaktoren

Der Ursprung ovarialer Malignome ist seit Jahren Gegenstand zahlreicher Investigationen. Bis vor einiger Zeit wurde angenommen, dass Tumoren in Geweben, die sich embryologisch aus den Müllergängen entwickeln, vergleichbaren Entstehungsmechanismen unterliegen. Unterschiede im Expressionsprofil verschiedener Proteine ließen diese Theorie jedoch unwahrscheinlich werden [Kowalski et al. 1997; Chen et al. 2003]. Neuere Studien geben Hinweise dafür, dass sich das seröse Ovarialkarzinom, welches das häufigste ist, aus Malignomen der Tube entwickelt [Pere et al. 1998; Salvador et al. 2009].

Verschiedene Faktoren scheinen für die Tumorgenese eine Rolle zu spielen. Risikoerhöhend wirken sich eine frühe Menarche und späte Menopause aus. Demnach führt der Ovulationsvorgang zu einer Verletzung des ovarialen Epithels und lässt dieses anfälliger werden für Mutationen [Fathalla 1971]. Zu dieser These passt die Erkenntnis, dass das Erkrankungsrisiko für Frauen mit vielen Schwangerschaften, langen Stillzeiten oder unter Einnahme von oralen Kontrazeptiva verringert ist. Widersprüchlich ist

allerdings, dass auch die Kontrazeption mit einem Progesteronpräparat alleine, welches keine Ovulationshemmung bewirkt, das Karzinomrisiko senkt.

Die Einnahme von Gonadotropinen, z.B. im Rahmen einer Infertilitätstherapie, führt ebenfalls zu erhöhtem Risiko [Whittemore et al. 1992]. Ursächlich dafür ist u.a. die erhöhte Ausschüttung von FSH, welches die Expression von EGFR (*epithelial growth factor receptor*), HER-2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) und des Onkogens c-myc steigert [Choi et al. 2004]. Ein weiterer Risikofaktor ist die Einnahme von Androgenen, z.B. im Rahmen einer Therapie bei PCOS (*polycystic ovarian syndrome*), Hirsutismus oder Akne. Inflammatorische Prozesse mit Zytokinausschüttung, wie sie auch bei der Ovulation stattfinden, führen durch Reparation und Gewebeumbau zu Instabilität und fehlerhafter DNA-Reparatur. Sie prädisponieren ebenfalls für die Entstehung eines ovariellen Malignoms [Ness and Cottreau 1999]. Dementsprechend ist die Einnahme von antiinflammatorischen Medikamenten (NSAID) ein potenzieller Schutzfaktor.

Etwa 10% aller Ovarialkarzinome sind hereditär, wobei 90% davon eine BRCA1- oder BRCA2-Mutation aufweisen (HBOC; engl. *hereditary breast and ovarian cancer syndrome*). Das Lebenszeitrisiko von Frauen mit BRCA1-Mutation am Ovarialkarzinom zu erkranken liegt bei 16-44%, mit BRCA2-Mutation bei 16-27%. Genexpressions-Profile von BRCA1-, BRCA2-mutierten sowie sporadischen Karzinomen zeigen, dass v.a. unter den beiden Mutationsträgervarianten Unterschiede bestehen, die sporadischen Tumoren jedoch Charakteristika beider Typen besitzen [Jazaeri et al. 2002]. Im klinischen Vergleich zeigen hereditäre High-Grade Tumoren einen günstigeren Verlauf als sporadische [Cass et al. 2003].

Ebenfalls gefährdet sind Träger von Mutationen in verschiedenen Mismatch-Repair Genen, bekannt als das Lynch Syndrom oder HNPCC (*hereditary nonpolyposis colon cancer*). Sie haben ein kumulatives Erkrankungsrisiko von 12%.

Gemäß der Theorie, dass die Karzinogenese eine Abfolge von Mutationen und korrespondierenden Zellveränderungen ist, sind beim Ovarialkarzinom bereits diverse Gene identifiziert worden, deren Regulation in verschiedenen Stadien eine Rolle spielt. Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 [Marks et al. 1991], Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren der HER-Familie und Proteinen der RAS-RAF Signalkaskade [Singer et al. 2003] sowie erhöhte zirkulierende und zelluläre Konzentration von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) sind beispielhaft dafür [Landen et al. 2008].

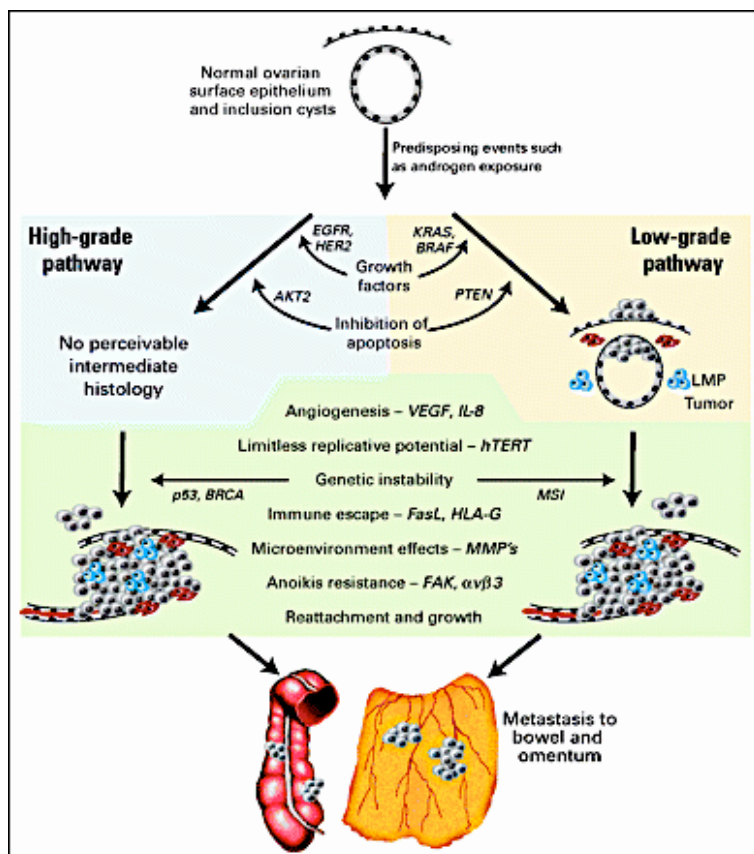


Abb.1.1 Modell zur Entstehung des Ovarialkarzinoms [Landen et al. 2008]; demnach ist das ovariale Epithel physiologischen Prozessen ausgesetzt, die zu Mutationen oder anderen genetischen Veränderungen führen können. Dadurch entsteht u.a. unreguliertes Wachstum. Resistenzen gegenüber wachstum-inhibierenden Signalen, Apoptose-inhibition, Angiogenese und die Invasion der Basalmembran werden ermöglicht. Die Reihenfolge dieser Ereignisse ist noch unklar, allerdings spielt sie vermutlich eine Rolle bei der Entwicklung verschiedener histologischer Subtypen und Grade.

Histologisch werden beim ovarialen Tumor epitheliale von nicht-epithelialen Tumoren unterschieden. Da Tumoren epithelialen Ursprungs mit etwa 90% der Neoplasien am häufigsten vorkommen und Gegenstand dieser Arbeit sind, wird im Folgenden nur der Terminus „Ovarialkarzinom“ verwandt.

Epitheliale Tumoren werden in benigne, maligne und Borderline-Tumoren (LMP; *low malignant potential*) untergliedert. Letztere invadieren das Stroma im Gegensatz zum Karzinom nicht, können aber extraovariale Metastasen bilden. Das mittlere Erkrankungsalter bei Borderline-Tumoren liegt bei 45 Jahren, d.h. etwa 10 Jahre unter dem beim malignen Ovarialkarzinom. Dieses kann histologisch in seröse (50%), muzinöse (10%), endometrioid (20%), klarzellige (5-10%), transitionalzellige (Brenner; selten) und entdifferenzierte Adenokarzinome gegliedert werden. Eine Sonderform stellt das extraovariale Ovarialkarzinom (sog. primäres Peritonealkarzinom) dar. Es entspricht einer disseminierten Peritonealkarzinose.

Neuere Versuche, Ursprung, Entwicklung und Subtyp in Kategorien zu vereinen, sehen eine Unterteilung des epithelialen Malignoms in Typen 1 und 2 vor [Kurman and Shih 2010]. Zum Typ 1, der i.d.R. indolent und auf das Ovar beschränkt auftritt, gehören low-grade-seröses und -muzinöses sowie klarzelliges und transitionales Karzinom. Diese

sind genetisch relativ stabil. Typ 2 Tumoren (high-grade serös, undifferenziert und mesodermal) hingegen zeigen zu über 80% Mutationen im p53-Gen und überschreiten in der Mehrzahl die Grenzen des Ovars. Zu diesen gehören etwa 75% aller Ovarialkarzinome und sie sind verantwortlich für 90% der Mortalität aller ovarialen Neoplasien [Guth et al. 2007].

Da Typ 1 Tumoren genetisch den benignen Zysten sehr ähnlich sind, wird eine kontinuierliche Tumorprogression, möglicherweise mit der Zwischenstufe des Borderline-Tumors, postuliert. Typ 2 Tumoren auf der anderen Seite entstehen schnell, direkt und werden deshalb erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert (s. Abb. 1.1).

Zu den nicht-epithelialen Tumoren zählen Keimzelltumoren, Keimstrang-Stromatumoren und Metastasen.

Die Ausbreitung der Tumorzellen findet primär *per continuitatem* intraperitoneal statt. Die Peritonealflüssigkeit verteilt die Zellen dabei vom Becken bis zum Zwerchfell. Lymphogene Metastasierung erfolgt über das Ligamentum latum zu den pelvinen und entlang der ovarialen Gefäße zu den paraaortalen und parakavalen Lymphknoten. Eine hämatogene Aussaat ist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung selten.

1.1.2. Diagnostik und Therapie

Charakteristisch ist die symptomlose Frühentwicklung des Ovarialkarzinoms, weshalb diese Tumoren zumeist erst sehr spät diagnostiziert werden können. In 10-15% der Fälle ist eine postmenopausale Blutung der erste Hinweis. Spätsymptome kommen v.a. durch Bildung von Aszites und Darmbefall zustande. Dies können u.a. Stuhlunregelmäßigkeiten, Obstipation oder Diarrhoen sein. Optisch fallen die Patientinnen im fortgeschrittenen Stadium häufig erst durch eine Zunahme des Bauchumfangs und allgemein durch Kachexie mit typisch eingefallenem Gesicht (Facies ovarica) auf.

Ein frühes Screening existiert derzeit noch nicht. Bei Verdacht ist neben dem Tastbefund die Transvaginalsonographie die sensitivste Methode [Predanic et al. 1996]. In 80% aller epithelialen Neoplasien ist der Tumormarker CA-125 erhöht. Die nötige Sensitivität für ein effizientes Screening auf der Basis von solchen Markern kann jedoch nicht erreicht werden, weshalb CA-125 der Kontrolle des Therapieverlaufs und -erfolgs vorbehalten ist. Entscheidend für die Therapie und Prognose des Ovarialkarzinoms ist die Einteilung in Stadien (FIGO I-IV). FIGO I Tumoren (bei Erstdiagnose 19%) sind auf das Ovar begrenzt, FIGO II (6%) entspricht der Ausbreitung im kleinen Becken, im Stadium III

(55%) überschreitet der Tumor die Beckengrenzen bzw. weist regionäre Lymphknotenmetastasen auf und im Endstadium IV (20%) sind Fernmetastasen nachweisbar.

Erstes therapeutisches Ziel bei Borderline- und malignen Tumoren ist die vollständige operative Entfernung des Tumorgewebes, da der postoperative Verbleib von Tumorresten entscheidend für die Prognose der Patientin ist. Ab FIGO Stadium Ia G3 ist eine adjuvante platinhaltige Chemotherapie empfohlen.

Intraoperativ wird zunächst ein umfassendes chirurgisches Staging durchgeführt, da sich etwa ein Drittel der klinisch als FIGO I eingestuftten Karzinome postoperativ als Stadium IIIC Tumoren erweisen. Die Exploration der gesamten Bauchhöhle einschließlich der spülzytologischen Entnahme von Aszites und Probebiopsien gehört zu diesem standardisierten Prozedere. In der Regel erfolgt eine Hysterektomie und Adnexektomie beidseits sowie die infragastrische Entfernung des Omentum majus, der pelvinen und paraaortalen Lymphknoten und ggf. der Appendix. Sind Anteile des Darms oder anderer Organe befallen, werden diese ebenfalls reseziert. Bei Frauen mit Karzinom im FIGO Stadium Ia können, insofern Kinderwunsch besteht, das kontralaterale Ovar und der Uterus belassen werden.

Bei Borderline- und gut differenzierten FIGO Ia Tumoren kann auf eine adjuvante Chemotherapie verzichtet werden. Ab FIGO Ia G3 wird eine platinhaltige Monotherapie durchgeführt, wobei i.d.R. über 4-6 Zyklen im Abstand von drei Wochen Carboplatin appliziert wird. Dies verbessert das 5-Jahres Überleben von 74% auf 82% beim frühen Ovarialkarzinom [Trimbos et al. 2003]. Fortgeschrittene Tumoren erfordern eine adjuvante Kombinationstherapie mit Carboplatin und Paclitaxel über 6 Zyklen.

Postoperativ erfolgt neben der Rehabilitation eine engmaschige (alle drei Monate in den ersten drei Jahren) Kontrolle abhängig von der Primärtherapie. Routinemäßige laborchemische und apparative Diagnostik wird bei symptomfreien Patienten nicht empfohlen (Ausnahme sind Keimzell- und Keimstrang-Stroma-Tumoren), da Auffälligkeiten ohne klinisches Korrelat zu keiner therapeutischen Maßnahme führen und die Lebensqualität der Patientin ungünstig beeinflussen. Erst bei klinischem Verdacht sollte eine adäquate Diagnostik zum Ausschluss eines Tumorrezidivs erfolgen. Die Therapie richtet sich dann individuell nach Art des Tumors, Allgemeinzustand der Patientin und im Besonderen nach der Aussicht auf Heilung durch eine erneute Operation.

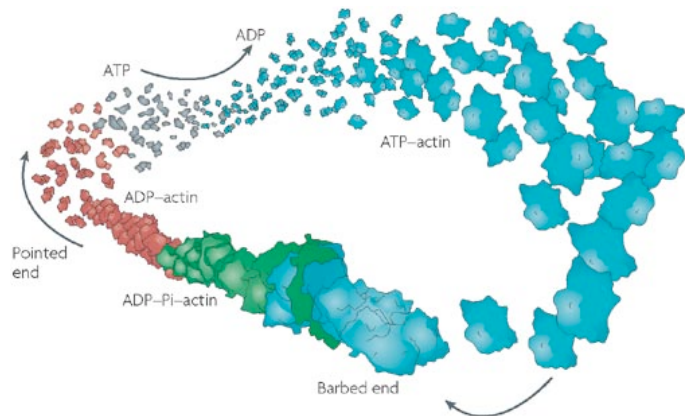
1.2. Aktinfilamente und Aktin-bindende Proteine

In eukaryontischen Zellen ist Aktin eines der Hauptkomponenten des Zytoskeletts. Es ist beteiligt an diversen zellulären Prozessen wie Zellbewegung, Kontraktilität, während Mitose und Zytokinese sowie beim intrazellulären Transport, Endozytose, Sekretionsvorgängen und Signaltransduktion [Zheng et al. 2009].

Aktinfilamente, genannt F-Aktin, werden spontan und unter Verbrauch von ATP aus G-Aktin-Monomeren (globuläres Aktin) gebildet. Zuvor findet eine Zusammenlagerung der Monomere statt, dies wird als Nukleation bezeichnet. Unter dem Einfluss von Nukleationsfaktoren formieren sich Dimere oder Trimere, welche wiederum den Grundbaustein von F-Aktin bilden [Hild et al. 2010]. Strukturell entsprechen diese einer rechtsgängigen Doppelhelix mit einem *barbed* bzw. (+)-Ende und gegenüberliegend dem *pointed* bzw. (-)-Ende. Abhängig von der kritischen Konzentration des G-Aktin-Pools in der Zelle stellt sich ein Gleichgewicht zwischen As- und Dissoziation von Monomeren an die Filamentenden ein. Im physiologischen Bereich wird dabei präferiert am (+)-Ende verlängert [Carlier and Pantaloni 1997].

Abb. 1.2 Aktinfilament- „Treadmilling“

Dabei assoziiert ATP-gebundenes Aktin an das (+)-Ende von F-Aktin unter Hydrolyse von Phosphat. Das ADP-Aktin bildet in diesem Prozess das Filamentende und dissoziiert von diesem, wonach es dem Austausch von ADP zu ATP und damit der erneuten Assoziation an F-Aktin wieder zur Verfügung steht [Pak et al. 2008]. Die drei Stadien können unter den Begriffen (1) Nukleation, (2) Elongation und (3) Steady state subsumiert werden [Pak et al. 2008].



Unbeeinflusst läge Aktin in der Zelle fast vollständig als F-Aktin vor und die Veränderung der Zellstruktur wäre ein relativ langsamer Prozess. Verschiedene Aktin bindende Proteine (ABP) sind deshalb im Stande, diese Vorgänge in unterschiedlichen Stadien zu beeinflussen und Zellbewegung zu initiieren und in ihrer Richtung zu dirigieren. Die Nukleation wird u.a. durch den ARP 2/3-Komplex, N-WASP, Formine, durch Spire, Cordon-Blue und Leiomodin moduliert [Firat-Karalar and Welch 2011].

Während der Elongation spielen andere ABP eine Rolle. Durch Zerschneiden regulieren z.B. Gelsolin, Villin, Fragmin und Adseverin die Länge der Filamente, wohingegen Capping Proteine durch Bindung an das (+)-Ende von F-Aktin weiteres Polymerisieren an dieser Stelle verhindern. Dadurch vergrößert sich die Menge von G-Aktin und die Nukleationsrate wird erhöht [Pollard and Cooper 1986]. Dies wiederum führt zu einer verstärkten Bildung von kurzen Aktinfilamenten und fördert damit die zelluläre Beweglichkeit. Solche ABP gehören u.a. zur Gelsolin-Superfamilie. Dies sind Gelsolin selbst, Adseverin, welches strukturell und funktional mit diesem besonders eng verwandt ist (ca. 60% identisch) und Villin. Dazu gehört auch CapG, welches zwar die Funktion des *capping* ausführt, nicht aber F-Aktin durchtrennen kann (siehe Kap. 1.3). Supervillin und Flightless I liegen, wie auch CapG, sowohl im Zytosol als auch im Nukleus vor. Dort werden sie mit Modulation von nukleären Rezeptoren in Verbindung gebracht [Archer et al. 2005].

Strukturell sind alle diese Proteine aus drei oder zweimal drei homologen Domänen von 15kD Länge, S₁ - S₆, aufgebaut [Kwiatkowski et al. 1989]. Diese sogenannten Gelsolin-*like* Domänen spielen jeweils eine Rolle bei der Ca²⁺ vermittelten F-Aktin-Bindung, beim *capping* sowie beim Durchtrennen und Bündeln der Filamente.

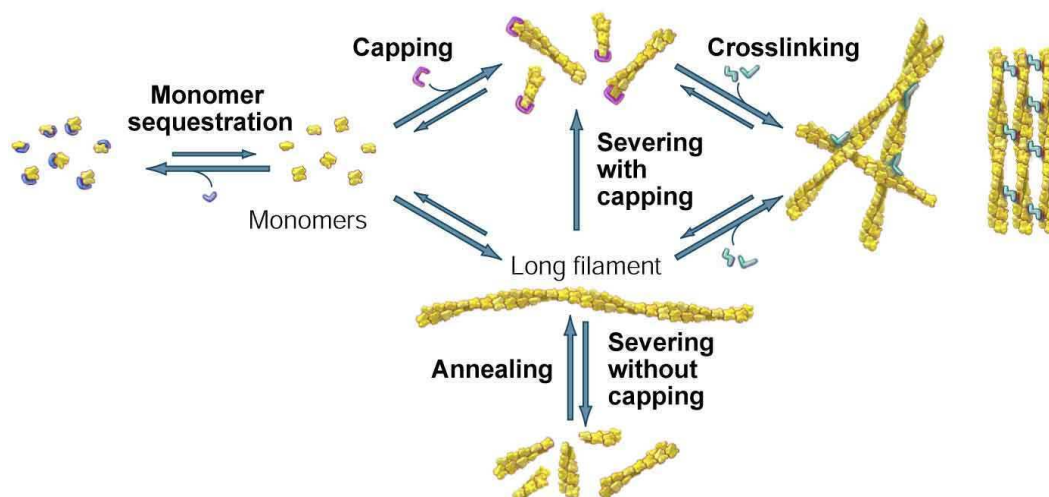


Abb. 1.3 Funktionen der ABP (Pollard and Earnshaw 2007); Monomer-bindendes Protein ist z.B. Profilin und sorgt u.a. dafür, dass ein hinreichend großer Pool unpolymerisierten Aktins in der Zelle vorliegt. Innerhalb der Gelsolin-Superfamilie gibt es Proteine, die sowohl trennen können als auch eine *capping* Funktion am (+)-Ende des F-Aktins (Gelsolin, Villin) innehaben sowie reine *capping* Proteine (CapG).

Noch relativ jung ist die Entdeckung von Aktin im Zellkern. Lange Jahre konnte man die Existenz von Kernaktin u.a. aufgrund von zytoplasmatischer Verunreinigung nicht nachweisen, aber jüngst wurde die Anwesenheit von monomerem, oligomerem und nun auch 20% polymerem Aktin im Kern gesichert [McDonald et al. 2006]. Letzteres wird besonders durch das Vorliegen von Nukleationsfaktoren wie Arp2/3 und N-WASP im Kern bestätigt. Auch andere im Nukleus vorliegende Aktin-bindende Proteine scheinen assoziiert mit Kernaktin. Profilin, ein Aktivator von G-Aktinen, ist beteiligt am Aktinexport aus dem Kern und lässt sich besonders in Regionen mit hoher Transkriptionsrate nachweisen, den sogenannten *nuclear speckles* [Skare et al. 2003]. Ebenso im Kern lokalisiert sind Cofilin, welches durch Schneiden von Filamenten den hohen Anteil G-Aktins und kurzer Aktinoligomere sicherstellt sowie β Thymosin. Desweiteren wurde Gelsolin gemeinsam mit Aktin als Teil des BAF53 Komplexes identifiziert. Dieser ist am *chromatin remodelling* beteiligt und führt u.a. zur Umorganisation der Nukleosomen sowie zur Histonacetylierung [Gieni and Hendzel 2009].

Unlängst konnte gezeigt werden, dass Aktin am Transkriptionsprozess beteiligt ist [Miralles and Visa 2006]. Aktin ist mit allen drei RNA-Polymerasen assoziiert. Eine Blockade der Aktinpolymerisation durch Stoffe wie Latrunculin B und Cytochalazin D führen dabei zu einer Inhibition der Transkription *in vitro* und *in vivo* [Ye et al. 2008].

1.3. Im Fokus: CapG

Dieses etwa 40kDa große Protein aus der Gelsolin-Superfamilie besteht aus 348 Aminosäuren und bindet an schnell-wachsende, positive oder *barbed ends* von F-Aktin und blockiert dadurch den Aufbau längerer Aktinfilamente. Als einziges der Aktin *capping* Proteine ist das humane CapG nicht fähig, Aktinfilamente auch zu durchtrennen [Yu et al. 1991].

CapG konnte 1986, zunächst Macrophage Capping Protein (MCP) genannt, aus Kaninchen-Makrophagen isoliert werden [Southwick and DiNubile 1986]. Mit ~1% des Gesamtproteins wird es in Makrophagen stärker exprimiert als Gelsolin [Dabiri et al. 1992]. Der Versuch, über Gelsolin-cDNA neue strukturähnliche Proteine zu identifizieren, führte auch in Mäusenieren-Gewebe zur Identifikation eines ca. 39kDa großen Proteins (gCap39), welches in Anwesenheit von Calcium an das Plus-Ende von Aktin bindet. Umgekehrt konnte eine reversible Hemmung durch PIP_2 nachgewiesen werden [Yu et al. 1990].

Auf der Suche nach einem dem c-Myc strukturell ähnlichen Protein wurde Mbh1 entdeckt, ein Protein, das Gemeinsamkeiten mit dem B/HLH (Helix-Loop-Helix)-Motiv aufweist [Prendergast and Ziff 1991]. Ein Abgleich mit Datenbanken ergab eine ~50% Übereinstimmung mit dem Aktin bindenden Protein Gelsolin und in ~33% mit Severin. Das Protein zeigte drei der sechs repetitiven Motive von Gelsolin. Diese erwiesen sich als notwendig für die Bindung an Aktin, so wie auch die Anwesenheit von Calcium.

Funktionell hat CapG einen selbstständigen Einfluss auf die Zellmotilität. Untersuchungen an Makrophagen demonstrierten, dass sowohl Zellbewegung als auch Phagozytose-Eigenschaften bei Verlust von CapG herabgesetzt sind und nach Re-Injektion wieder zurückkehren [Witke et al. 2001].

Es konnte gezeigt werden, dass CapG Protein sowohl im Kern wie auch Zytoplasma vorliegt [Onoda et al. 1993] und posttranslationalen Modifikationen unterliegt. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und Lokalisation im Zellkern postuliert [Onoda and Yin 1993]. Es scheint, dass das Verhältnis von sauren und basischen Varianten im Kern zu Ersteren verschoben ist mit einem 1,7-fach höheren Anteil phosphorylierter CapG-Varianten. Im Gegensatz zu anderen im Kern und Zytoplasma befindlichen Aktin bindenden Proteinen weist CapG keine nukleäre Exportsequenz auf [Van Impe et al. 2003]. Der Kernimport hingegen ist Importin- β abhängig. Durch Anhängen einer Exportsequenz zeigte sich eine geringere Invasion in eine Kollagen Typ I-Matrix. Dies lässt vermuten, dass insbesondere nukleäres CapG eine Rolle im Prozess der Invasion und damit der Entartung von Zellen spielen könnte. Das wurde durch weiterführende Experimente bestätigt: Down-Regulation der CapG-Expression in der Brustkrebszelllinie MDA-MB 231 resultiert in vermindertem Invasionsverhalten [Van den Abbeele et al. 2007; Seier 2009] *in vitro*. Andersherum konnte beim Mammakarzinom gezeigt werden, dass moderate Expression von CapG das Invasionsverhalten steigern kann. Interessant scheint hierbei besonders, dass das Invasivitätspotenzial möglicherweise mit der Lokalisation von CapG zusammenhängt. Diese könnte ausserdem durch das Ausmaß der Phosphorylierung beeinflusst sein. Ähnliche Zusammenhänge wurden bereits bei anderen ABP gefunden: Caldesmon stabilisiert in seiner Funktion Aktin-Filamente und ist an der Modulation von Aktin-Myosin-Interaktion beteiligt. Nach Phosphorylierung durch PFTK1, einer Cdc2-abhängigen Serin/Threonin Proteinkinase, werden vermehrt Aktin-Stressfasern gebildet. Caldesmon wurde darüberhinaus in Kontext mit dem hepatozellulären Karzinom

gebracht, wobei die phosphorylierte Variante eine führende Rolle zu spielen scheint [Leung et al. 2011].

Die Bedeutung von CapG bekräftigte auch die Studie von Dahl et al. [Dahl et al. 2005], wobei u.a. beim Mamma- und Ovarialkarzinom eine erhöhte Expression von CapG gefunden wurde. Für das Ovarialkarzinom im Speziellen wurde in den vergangenen Jahren mehrfach ein Zusammenhang zwischen Tumorgenese und Überexpression von CapG hergestellt [Partheen et al. 2008].

1.4. Potenzielle Zielgene von CapG bei Mamma- und Ovarialkarzinom in einer Microarray-Studie

Die Bedeutung von CapG als Onkogen wurde für das Mammakarzinom und andere Tumoren mit hohem metastatischem Potenzial bereits herausgestellt (s.o.). Die Tatsache, dass CapG in Tumorzellen überexprimiert wird, die Invasivität steigert und möglicherweise das Metastasierungsverhalten der Zellen beeinflusst, wirft die Frage nach molekularen Interaktionen dieses Proteins auf. Auf der einen Seite ist CapG als zytoplasmatisches, Aktin bindendes Protein an der Regulation der Zellbewegung maßgeblich beteiligt, auf der anderen Seite befindet sich ein signifikanter Anteil des Gesamtproteins im Zellkern, wo es möglicherweise zentrale Zellregulationsmechanismen beeinflusst. Der Frage nach potenziellem Einfluss von CapG auf die Regulation anderer, für die Tumorzellentwicklung entscheidender Proteine sollte in der folgenden Studie an Mammakarzinom-Zelllinien nachgegangen werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen dienen als Grundlage der vorliegenden Arbeit. Die Untersuchungen unterstanden der Annahme, dass die hormonabhängigen Tumoren Mamma- und Ovarial-Ca genetisch große Parallelen (vgl. BRCA 1/2-Mutationen etc.) haben und eine Interaktion von CapG mit anderen Proteinen daher potenziell in beiden Tumorentitäten auftreten könne.

Grundlage des Projekts war eine Microarray-Analyse, durchgeführt im Molekulargenetischen Labor der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf. Hierbei wurden vier Proben parallel mit dem One-Color Microarray der Firma Agilent® analysiert. Diese arbeitet nach dem Prinzip der Agilent 60-mer Sure-Print Technology.

Der Chip enthält Sequenzen von über 40.000 Genen, die das gesamte menschliche Genom repräsentieren sollen (Whole Human Genome Microarray). Die Genauswahl erfolgte durch Abgleich mit Datenbanken wie NCBI RefSeq. Vorliegende Oligo-

nukleotidsequenzen wurden sorgfältig ausgewählt nach Kriterien wie Einzigartigkeit (möglichst wenig Ähnlichkeit zu anderen Gen-Sequenzen), Komplexität, Schmelz-kurventemperaturen, etc.. Die Template-RNA wurde zunächst mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer auf Integrität und Quantität geprüft, bevor sie für den Microarray verarbeitet wurde.

Im Versuch wurden zwei Mammakarzinom-Zelllinien in ihrer CapG-Expression verändert. In der nativ hoch-exprimierenden Linie MDA-MB-231 wurde durch siRNA-Behandlung die Expression unterdrückt (ca. 30-fache Reduktion), während eine niedrig-exprimierende Linie BT-20 stabil mit CapG transfiziert wurde. Die Kontrolle erfolgte anhand von Western Blot Analyse und Real-time PCR. Die cRNA dieser vier Proben wurde schließlich mit dem Chip analysiert und das Ergebnis hinsichtlich möglicher Ko-Regulationen mit bzw. gegen CapG untersucht.

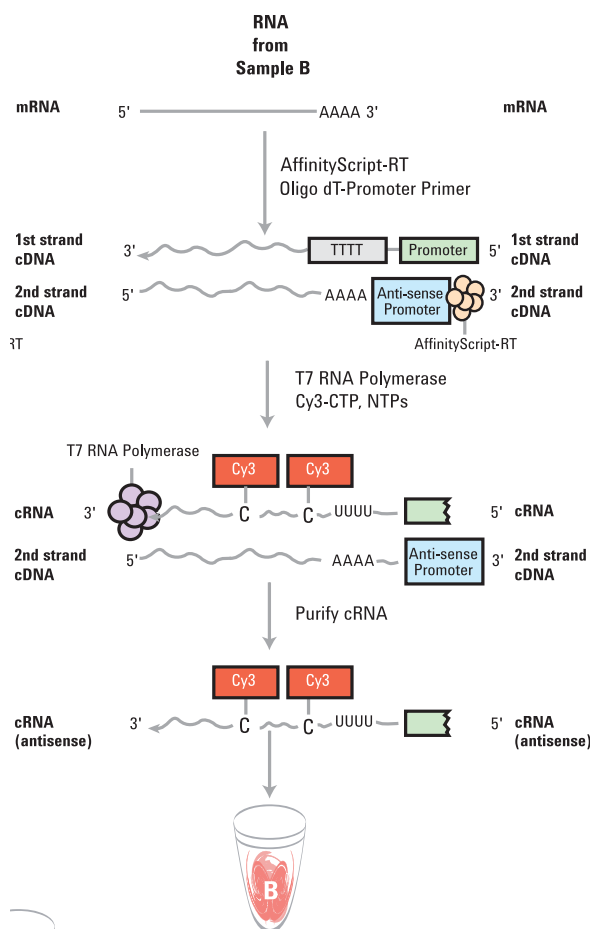


Abb. 1.4 Microarray:

In einem ersten Schritt wurden die Proben durch die T7-RNA-Polymerase amplifiziert und schließlich an die Oligonukleotide hybridisiert und gewaschen. Während der Amplifikation werden Cy3-markierte CTP gebunden, die später die Erfassung der hybridisierten cRNA-Moleküle möglich macht. Hiernach erfolgte das Scannen mit dem Agilent C Scanner, der es ermöglicht, die Sequenzen aus Vertiefungen von 5µm Diameter zu erfassen. Die Auswertung der Hybridisierungs-Fluoreszenzsignale (Cy3-Farbstoff) unterschiedlicher Stärken erfolgte mit der Agilent Feature Extraction Software (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis, Protocol Version 5.7, 2008, Agilent Technologies, USA)

Aus allen im Resultat differenziell regulierten Proteinen erfolgte eine erste Auswahl durch Ermittlung solcher Gene, die in beiden Zelllinien gleichermaßen entweder mit oder entgegen der CapG-Expressionen eine ≥ 2 -fache (MDA-MB-231) oder $\geq 1,5$ -fache (BT-20) Expressionsveränderung zeigten. Diese Gene wurden daraufhin einem weiteren Filter unterzogen.

In die engere Auswahl für eine weiterführende Analyse auch im Rahmen ovarialer Neoplasien kamen nur diejenigen Gene, die in der CapG-unterdrückten Zelllinie MDA-MB-231 mindestens 2,7-fach erhöht bzw. vermindert exprimiert wurden (in transfizierter BT-20 mind. 1,5-fach) und funktionell im direkten Zusammenhang entweder mit dem Aktinsystem und/oder Metastasierung bzw. Zellproliferation stehen. Auf eine in der Literatur beschriebene Verbindung zu Ovarialtumoren wurde ein besonderes Augenmerk gelegt.

Das Resultat der Auswertung legte eine tiefergehende Analyse folgender sechs Gene nahe:

	MDA-MB-231 (siRNA vs. unbehandelt)	Regulation	BT-20 (Überexpres- sion vs. Kontrolle)	Regulation
CapG	27,67	down	1,55	down*
Ankyrin 3	3,70	down	1,65	up
Betacellulin	7,50	down	2,06	up
IGF2	10,34	up	1,92	down
RASGRF1	5,59	down	1,67	up
STAT4	2,71	down	1,51	up
Thymosin β 15b	2,97	down	1,67	up

Tab. 1.1 Auswertung der Chip-Daten und Auswahl von sechs Genen, deren Expression mit der von CapG korreliert. Dargestellt ist der Faktor, um den sich die Expression verändert.

(*) Das Resultat (*down*) der CapG-Expression bei überexprimierenden BT-20 Zellen kam deshalb zustande, da das Oligonukleotid des CHIPs einen Abschnitt ausserhalb des kodierenden Gen-Bereiches von CapG abdeckte, der eingebrachte S11-CapG-IN-Vektor jedoch nur die kodierende Sequenz enthielt. Demnach wurde nur endogenes CapG nachgewiesen.

1.4.1. Ankyrin 3 (Ank3, Ankyrin-G)

Ankyrine verbinden integrale Membranproteine mit dem Spektrin-basierten Membranskelett der Zelle [Peters et al. 1995]. Bislang bekannt sind drei auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisierte Ankyrine: 1, 2 und 3 (auch Ankyrin G genannt aufgrund ZNS-spezifischer großer Isoformen). Verschiedene Splicing-Varianten führen zu Genprodukten unterschiedlicher Größe, wobei die beiden größten Isoformen (480 und 270kDa) neuronenspezifisch sind, während die kleinen Varianten (100-220kDa) in fast jedem Gewebe exprimiert werden [Bennett and Baines 2001]. Ankyrine bestehen aus drei Hauptdomänen. Die N-terminale Domäne enthält die Membranbindestelle sowie Bindestellen für Proteine wie z.B. die Na⁺/K⁺-ATPase. Eine Zweite bindet Spektrin und eine Dritte, C-terminal gelegen, gilt als variable regulatorische Domäne [Bennett 1992]. Funktionell ist Ank3 beteiligt an Zelladhäsion, Regulation von spannungsabhängigen Ionenkanälen in der Zellmembran und weiteren Membranproteinen. Es gibt jedoch bereits Hinweise, dass Ank3 ebenfalls einen Einfluss auf Metastasierung und Invasionspotenzial, z.B. bei Brustkrebs, hat [Bourguignon et al. 2000].

1.4.2. Betacellulin (BTC)

Betacellulin ist einer von mindestens elf Liganden aus der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren [McIntyre et al. 2010]. Zu ihren Tyrosinkinaserzeptoren gehören HER1-4 (ErbB), die bereits einen wichtigen Stellenwert in der Therapie von rezeptorstatus-positivem Brustkrebs innehaben [Scaltriti and Baselga 2006]. Die Aufgabe von Betacellulin liegt in der Initiierung u.a. von Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen [Dunbar and Goddard 2000]. Eine Überexpression von Betacellulin konnte bereits in verschiedenen gynäkologischen Tumoren gezeigt werden, darunter das Mamma- und Endometriumkarzinom [Srinivasan et al. 1999].

1.4.3. IGF2

Dieser Wachstumsfaktor (*Insulin-like growth factor*) reguliert Differenzierung, Proliferation und andere wichtige anabole Zelleigenschaften durch endogene Produktion in der Leber, aber auch durch parakrine und autokrine Stimulation unter den Zellen [LeRoith et al. 1995]. Veränderte Expression geht oft mit Hyper- oder Hypomethylierung der DNA

einher. So wurde auch beim Ovarialkarzinom eine promotornahe Hypomethylierung nachgewiesen [Murphy et al. 2006]. IGF2 ist ein *imprinted gene*, d.h. nur eines der elterlichen Allele wird exprimiert. Erkrankungen, wie z.B. das Beckwith-Wiedemann-Syndrom oder der Wilms-Tumor der Niere gehen mit vermindertem oder aufgehobenem *imprinting* einher [O'Dell and Day 1998]. Inhibition des IGF1-Rezeptors, der ebenfalls die IGF2-Stimulation transduziert, mindert das Wachstum und die Differenzierung von Brustkrebszelllinien [Arteaga and Osborne 1989].

1.4.4. RasGRF1

Dies steht für *Ras protein-specific guanine nucleotide releasing factor*, einem Nukleotid-Austauscher, der die Dissoziation des GDP von Ras fördert und damit den Spiegel des aktivierten Ras-GTP anhebt [Overbeck et al. 1995]. Seine Funktion übt dieses CDC25-homologe Protein in der Plasmamembran aus, wo auch Ras lokalisiert ist. Stimulation u.a. durch epidermale Wachstumsfaktoren führt zu einer Aktivierung dieser Austauscher über SOS1 [Quilliam et al. 1994]. Eine Überexpression von RasGRF1 wird mit verstärkter Ras-Aktivierung und damit u.a. unkontrollierter Zellproliferation in Verbindung gebracht.

1.4.5. STAT4

Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor (engl. *signal transducer and activator of transcription*), der nach Bindung von Zytokinliganden (insbesondere IL-12) an Tyrosinkinase-Rezeptoren dimerisiert und in den Nukleus transloziert [Imada and Leonard 2000]. STAT-Proteinen werden onkogene Eigenschaften zugeschrieben, da sie die Überexpression diverser Onkogene, darunter z.B. c-myc, induzieren und somit Tumorpherifation fördern [Buettner et al. 2002].

1.4.6. Thymosin β 15b

Dieses 5,3kDa große, erst 2006 durch Zetter et al. beschriebene Protein aus der β Thymosin-Familie bindet Aktinmonomere (G-Aktin) 1:1 und sorgt dadurch für konstant verfügbare Aktinbausteine [Huff et al. 2001]. Überexpression führt zu verstärkter

Zellmotilität und ist bereits in verschiedenen Tumorentitäten wie dem Prostata- und Mammakarzinom mit Metastasierung in Verbindung gebracht worden. Aber auch in nicht-metastasierten Tumoren konnte eine überdurchschnittliche Expression von Thymosin- β 15b nachgewiesen werden [Gold et al. 1997]

1.5. Zielsetzung

1. Nachdem gezeigt wurde, dass das CapG Protein in verschiedenen Tumorentitäten, darunter das Mamma-Ca, überexprimiert vorliegt und mit erhöhtem invasiven Potenzial in Verbindung gebracht wurde, ist es Ziel der vorliegenden Arbeit, zunächst einen solchen Einfluss von CapG beim Ovarialkarzinom zu überprüfen. Dazu soll die CapG-Expression in einem OvCa Tumorkollektiv ermittelt werden.
2. Im Speziellen wird der funktionelle Aspekt des Proteins im Hinblick auf das Migrations- und Invasionsverhalten von OvCa Zellen untersucht. Dazu dienen OvCa Zelllinien als Modell, wobei die CapG-Expression derart durch stabile Transfektion des CapG Gens und siRNA vermittelte Reduktion moduliert wird, dass ein geeignetes Vergleichssystem zwischen hoch und niedrig exprimierender Zelle entsteht.
3. Verschiedene Gruppen haben einen Zusammenhang zwischen Lokalisation des CapG Proteins und Invasivitätspotenzial der Tumorzellen postuliert. Dieser Frage soll mittels subzellulärer Fraktionierung nachgegangen werden. Ebenfalls von Interesse ist hierbei der Phosphorylierungsgrad des CapG Proteins bezogen auf dessen Lokalisation sowie dem Invasivitätsverhalten der untersuchten Zelllinie. Zweidimensionale gelelektrophoretische Auftrennungen sollen Aufschluss über möglicherweise veränderte posttranslationale Modifikationen von Kern-CapG geben. Für Letzteres war bereits ein Zusammenhang mit gesteigerter Invasivität postuliert worden.
4. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ist die Korrelation zwischen CapG und möglichen Zielgenen. Dies basiert auf der Annahme, dass Kern-CapG direkt oder indirekt über Kern-Aktin einen Einfluss auf die Transkriptionsregulation verschiedener Gene bei Mamma Ca Zelllinien nimmt (Daten einer Microchip-Analyse, bei der die CapG-Expression zweier Mamma Ca Zelllinien moduliert wurde und die Expressionsprofile von 40000 Genen auf eine differenzielle Regulation im Zusammenhang mit der CapG-Expressionsänderung hin untersucht wurden). Es sollen nun ko-regulierte Gene in einem ähnlichen Versuchsmodell auf OvCa Zelllinien bezogen und in ihrer Bedeutung für das Ovarialkarzinom untersucht werden. Die Expressionen möglicher Targetgene sollen darüber hinaus in einem OvCa Gewebeprobenkollektiv überprüft und einem Normalkollektiv gegenüber gestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Molekularbiologische Methoden

2.1.1. RNA-Isolierung

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte sowohl mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers als auch unter Verwendung von TRIzol™ (GIBCO, Karlsruhe). Bei letzterer Methode, die auf einer monophasischen Phenol-Guanidin-isothiocyanat-Lösung zum Schutze der RNA-Integrität basiert, wurden die Zellen zunächst mit Trypsin gelöst, zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Pellets durch Zugabe von 1ml TRIzol™ lysiert. Hiernach konnte das Lysat bei Bedarf bei -80°C eingefroren werden.

Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT) erfolgte die Zugabe von von 200µl Chloroform, 15 Sekunden Invertieren und eine kurze Inkubation bei RT. Die Suspension wurde daraufhin 15min. bei 4°C und 13800rpm zentrifugiert, die Oberphase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 500µl Isopropanol versetzt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation (4°C, 13800rpm) wurde das Pellet mit 1ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 5min. (4°C, 9000rpm) zentrifugiert. Es folgte ein Trockenschritt im Thermoblock bei 55°C. Die Ausbeute konnte schließlich in 20-100µl dH₂O aufgenommen und quantifiziert werden.

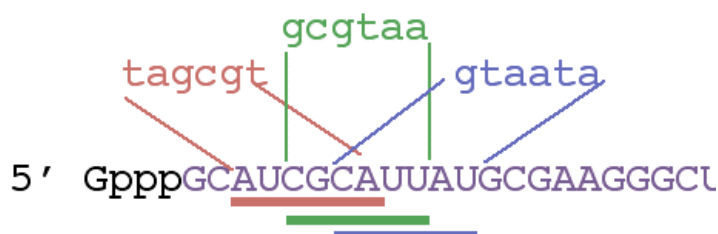
2.1.2. Quantifizierung von RNA

Die Konzentration der RNA-Proben wurde mit dem NanoDrop™ 1000UV-Vis Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Dazu wurden nur 1µl der jeweiligen RNA benötigt, photometrisch gemessen und mit der ND-1000 PC-Software ausgewertet.

2.1.3. cDNA- Synthese

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte mit dem Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden). Random Primer, sogenannte

Random-Hexamere liegen in statistischer, unspezifischer Zusammensetzung vor und können folglich an den verschiedensten Stellen des RNA-Moleküls hybridisieren. Dies ermöglicht eine cDNA-Synthese über die gesamte Länge der RNA. Sequenzverluste, z.B. am 5'-Ende durch vorzeitigen Syntheseabbruch, können somit verhindert werden.



Pro Ansatz wurde 1 µg RNA auf ein Volumen von 12,75 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt und 5 Minuten bei 65°C denaturiert. Die Proben wurden daraufhin auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. Der Reaktionsansatz wurde nach Angaben des Herstellers pipettiert (Tabelle 1.1). Je 7,25 µl davon wurden der denaturierten RNA beigefügt und anschließend für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Dem folgte eine 5-minütige Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 95°C. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren, die restliche RNA bei -80°C gelagert.

Reaktionsansatz	Menge (µl)
10x Puffer	2,0
dNTP	2,0
RandomPrimer	2,0
9,5U ReverseTranskriptase	1,0
20U RNase-Inhibitor	0,25

Tab. 2.1 Reaktionsansatz cDNA-Synthese

2.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Dieses von Kary B. Mulis 1987 entwickelte Verfahren dient der Amplifikation bestimmter Zielsequenzen einer Template-DNA mithilfe einer Taq-DNA-Polymerase ohne 3'-5'-Exonukleasefunktion (Roche, Mannheim), spezifischen Oligonukleotid-Primerpaaren, Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP; je 1mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), Reaktionspuffer und Aqua_{dest.}

Jeder Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstrangs bei 95°C. Hierbei werden die DNA-Stränge langsam aufgeschmolzen. Bei 60°C werden daraufhin die synthetischen Oligonukleotide an die komplementären DNA-Sequenzen hybridisiert, woraufhin die Taq-Polymerase bei 72°C die Amplifikation ausführt.

Die Amplifikation erfolgte mit dem Thermocycler T3000 (Biometra, Göttingen).

2.1.5. β -Aktin-PCR zur Kontrolle der cDNA-Synthese

Verunreinigung der synthetisierten cDNA-Fragmente durch genomische DNA bzw. Pseudogene wurde mittels β -Aktin-PCR ausgeschlossen. Mit den ausgewählten Primern kann nach gelelektrophoretischer Auftrennung im 1,5%igem Agarosegel bei gDNA ein größeres Fragment (652bp) nachgewiesen werden als bei cDNA. Kontaminationen konnten daher deutlich von cDNA-Amplifikaten unterschieden werden.

Primer	Sequenz	Produktgröße (bp)
β -Aktin Frw	AGA GAT GGC CAC GGC TGC TT	446
β -Aktin Rev	ATT TGC GGT GGA CGA TGG AG	

Tab. 2.2 Primer für die β -Aktin PCR

Der Reaktionsansatz pro cDNA betrug 18 μ l plus 2 μ l zu amplifizierender cDNA. Dabei wurden 2 μ l Reaktionspuffer, 1,6 μ l dNTP, je 1 μ l Primer Frw/ Rev sowie 0,2 μ l Taq-Polymerase (GE Healthcare) mit 12,2 μ l Aqua_{dest.} verdünnt. Den 18 μ l Mastermix wurden jeweils 2 μ l cDNA (Verdünnung 1:10) hinzugefügt, gemischt, zentrifugiert und etwa 3 Stunden im Thermocycler amplifiziert. Pro Lauf sicherte eine Negativkontrolle die Qualität. Die Proben wurden daraufhin bis zur Gelelektrophorese bei -20°C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Reaktionsansatz	Volumen (µl)	Reaktionsbedingungen
dH ₂ O	12,2	95°C, 10 min.
10x Puffer	2,0	
5'-Primer	1,0	95°C, 30sec.
3'-Primer	1,0	60°C, 1min.
dNTP	1,6	72°C, 1min.
Taq-Polymerase	0,2	72°C, 8min.
Template (cDNA)	2,0	

Tab. 2.3 β-Aktin-PCR, Ansatz und Reaktionsbedingungen, insg. 35 Zyklen

2.1.6. Quantitative Real-time PCR

Diese Methode ermöglicht, im Gegensatz zur einfachen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die direkte Quantifizierung des Primerprodukts. Dies geschieht durch Anlagerung eines interkalierenden Cyanin-Farbstoffs (SYBR®Green, Qiagen), der nur an dsDNA bindet und dessen Signal daher mit der Zunahme an Amplifikaten korreliert. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgt jeweils am Ende der Elongation in jedem Zyklus. Gemessen wird der C_T-Wert (*cycle threshold*), der angibt, ab welchem Zyklus die Signalstärke erstmalig die Hintergrundfluoreszenz übersteigt um dann in einer exponentiellen Phase stark anzusteigen. Dieser Schwellenwert ist festgelegt und ist niedriger, je mehr Ausgangs-DNA im Reaktionsansatz vorliegt.

Für die Durchführung wurden QuantiTect™SYBR®Green Kits der Firma Qiagen verwendet. Je 13,5µl Reaktionsansatz (7,5µl SYBR®Green, 1,5µl Primer, 4,5µl RNase-freies H₂O) wurde 1,5µl cDNA zugegeben und für etwa 90 min. im FAST-Modus des 7500Fast-Realtime-Systems (Applied Biosystems) prozessiert.

Eine anschließende Überprüfung der Schmelzkurven diente dem Ausschluss fälschlich detektierter Primerdimer-Sequenzen durch den Fluoreszenzfarbstoff. Dabei registriert der Sensor während des langsamen Aufschmelzens (50°C bis 95°C, kontinuierlicher Temperaturanstieg) der dsDNA im ersten Schritt der Amplifikation einen Abfall des Signals, da dsDNA kurzzeitig als ssDNA vorliegt und der Farbstoff nicht mehr binden kann. Spezifische PCR-Produkte haben einen höheren Schmelzpunkt als Primerdimere und können deshalb unterschieden werden.

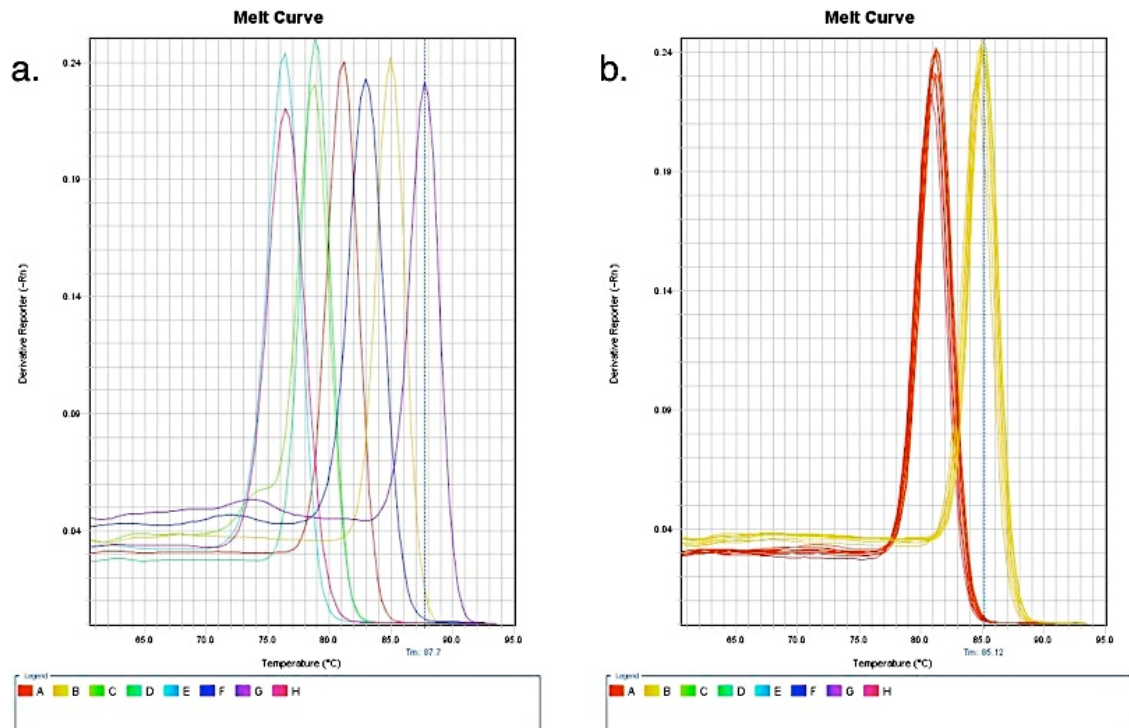


Abb. 2.1 Schmelzkurvenanalyse; bei der Auswertung der Ovar-Tumorgewebsproben (cDNA) hinsichtlich ihrer Expression von CapG, GAPDH als Referenz und den 6 Kandidatengenen erfolgte diese Analyse zur Verifizierung eines einheitlich eingesetzten cDNA-Gehalts sowie zum Ausschluss von Nebenprodukten wie z.B. Primerdimeren oder Verunreinigungen durch Fremd-DNA bzw. Post-PCR-Produkte

- Analyse aller 8 untersuchten Gene in einer cDNA-Probe; die unterschiedliche Positionen der Kurven-Peaks sind auf die individuellen Schmelztemperaturen zurückzuführen
- im Vergleich sind CapG (rot) und GAPDH (gelb) von jeweils acht verschiedenen cDNA-Proben aufgetragen; die einheitlichen Kurvenverläufe bestätigen, dass bei allen Proben dasselbe PCR-Produkt entstanden ist; die Divergenz der Kurvenhöhe innerhalb eines Primerproduktes liegt an der unterschiedlichen Expressionsquantität unter den cDNA-Proben

Die Datenauswertung erfolgte nach der komparativen Methode ($\Delta\Delta C_t$ -Methode). Die C_T -Mittelwerte der Proben wurden von den Mittelwerten einer Kontrolle subtrahiert und verglichen. Als Referenz diente das *housekeeping*-Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Dieses ermöglichte ebenfalls die Gewährleistung einer konstanten Effizienz der Methode, welche Voraussetzung für die $\Delta\Delta C_t$ -Methode ist. Die Versuche wurden jeweils dreifach wiederholt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's *t*-Test.

2.1.7. High Resolution Melting (HRM)

Die Analyse von *single nucleotide polymorphisms* (SNP) mittels High Resolution Melting ermöglicht DNA Charakterisierung anhand ihrer Dissoziationskurve. Ermittelt wird hierbei die Temperatur, bei welcher Doppelstrang-DNA (dsDNA) zu Einzelstrang-DNA (ssDNA) aufgeschmolzen wird. Vorteil dieser Methode ist neben ihrer hohen Sensitivität und Spezifität (P. A. Norambuena et al., 2009) eine lückenlose Probenprozessierung in nur einem Tube.

Zunächst wird die Targetsequenz mithilfe quantitativer Real-time PCR amplifiziert. Der interkalierende Farbstoff (SYTO®9, Invitrogen), der nur im dsDNA-Zustand mit der DNA interagiert und dabei grün fluoresziert, dient dabei der Quantifizierung des Amplikons. In einem zweiten Schritt, der HRMA (*High Resolution Melting Analysis*), wird die temperaturabhängige DNA-Strangdissoziation gemessen. Das Fluoreszenzsignal lässt beim Übergang von dsDNA zu ssDNA nach und ermöglicht so die Messung einer für diese DNA-Sequenz charakteristische Schmelzkurve.

Der spezielle Farbstoff zeichnet sich durch besonders niedrige Toxizität aus und kann deshalb in höheren Konzentrationen eingesetzt werden. Damit kann eine stärkere Sättigung der DNA erzielt werden (PT Monis et al., 2005), was zu entsprechend stärkeren Signalunterschieden und damit einer höheren Validität führt.

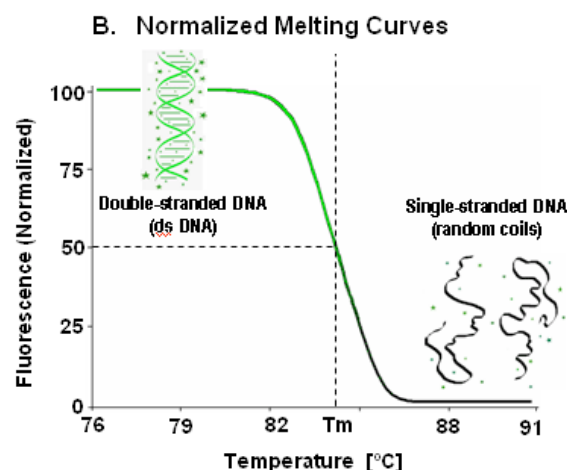


Abb. 2.2 Schema einer Schmelzkurve (Corbett Life Sciences)

Bei der SNP Analyse zeigen die Allelvarianten unterschiedliches Schmelzverhalten. Zum Beispiel ist bei Heterozygotie durch die gestörte Heteroduplexbildung während des

Annealing die Bindung destabilisiert und lässt sich früher aufschmelzen als dies bei homozygoten Varianten der Fall ist. Heterozygote sind daher einfacher zu detektieren als homozygote Allele, da diese sich lediglich durch Verschiebung, nicht jedoch in der Form der Kurve unterscheiden.

Zur Analyse des SNP rs6886 wurden zunächst 3 Zelllinien ausgewählt, deren Schmelzkurven sich unterschieden. Per Sequenzierung (durchgeführt durch das BMFZ, Universität Düsseldorf) konnten die der Schmelzkurve zugehörigen Allele ermittelt werden (T47D A/A, Hec1A G/G und MDAMB231 G/A).

Ansatz	Menge (µl)
dH ₂ O	11,6
Puffer	2
dNTP	1,6
Primer _F	1
Primer _R	1
SYTO®9	0,6
TaqPolymerase	0,2

Tab. 2.4 Ansatz HRM Analyse

Stage	Temperatur	Zyklen
1- Holding Stage	10min.Anstieg auf 95°C	
2- Cycling Stage	30 Sek. 95°C	45
	30 Sek. 60°C	
3- Melt Curve Stage	15 Sek. 95°C	kontinuierlich
	1min. 60°C	
	15 Sek. 95°C	
	15 Sek. 60°C	

Tab. 2.5 Phasen und Zyklen der HRMA

Pro Ansatz wurden 11,6µl dH₂O, 2µl Puffer, 1,6µl dNTPs, je 1µl PrimerForward and Rewind sowie 0,6µl des fluoreszierenden Farbstoffs SYTO®9 und 0,2µl Taq-Polymerase

Gold (AmpliTaQGold®, Applied Biosystems) pipettiert und diese 18µl Mastermix mit 2µl Blut-DNA gemischt.

Durchgeführt wurde die Real-time PCR und post-PCR HRM mit dem Gerät 7500 Fast-RealTime-PCR System der Firma Applied Biosystems.

2.1.8. Agarose-Gelelektrophorese

Im Gegensatz zu Polyacrylamidgelen sind Agarosegele relativ großporig und eignen sich daher für den Nachweis von DNA-Molekülen. Die Agarose bildet beim Aufkochen Doppelhelices aus, die sich in Gruppen parallel zu Fäden zusammenlagern. 1,5%ige Agarose eignet sich für die Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich von 0,2 bis 3kb.

Um die negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle aufzutrennen, wird ein elektrisches Feld verwendet. Die Moleküle wandern entsprechend zur Anode, wobei die Größe des Fragments für die Laufgeschwindigkeit entscheidend ist.

Für 1,5%ige Agarose-Gele wurde 1,5g Agarose (Life Technologies, Darmstadt) mit 100ml TBE-Puffer (0,2M Tris-HCl, 0,17M Borsäure, 2mM EDTA, pH 8,0) aufgekocht.

Die Probe wurde zunächst 1:1 mit Probenpuffer (7M Urea, 50mM Tris-HCl, 40%Glycerin, 0,1%Bromphenolblau, pH 8,0) verdünnt. Je 10µl verdünnte Probe wurden aufgetragen. Als Standard diente der SmartLadder-Größenstandard (Eurogentec, Köln). Für die Elektrophorese wurde über 60 bis 120min. eine Spannung von ca. 100V (Power Supply, BioRad, München) angelegt und das Gel anschließend 30min. in Ethidiumbromid-Lösung (10µg/ml) gefärbt. Zuletzt erfolgte die Detektion der Banden unter UV-Licht (Wellenlänge 312nm).

2.1.9. Tumorproben

Für die HRM Analysen (s. Kapitel 3.9.) wurde Blut-DNA von 262 Frauen mit einem Ovarialkarzinom verwendet, welche in der Frauenklinik des Universitätsklinikum Düsseldorf von 1997 bis 2006 asserviert worden war. Die Altersspanne lag dabei zwischen 16 und 90 Jahren mit einem Altersdurchschnitt von ca. 61 Jahren. Das Durchschnittsalter im Tumor Kollektiv war 70 Jahre (44-78 Jahre).

Im Rahmen der Expressionsanalysen (Kapitel 3.1.) diente ein 30 Gewebe DNA-Proben umfassendes OvCa Tumorkollektiv als Grundlage. Die Operationen waren zwischen

1994 und 1997 erfolgt, die Altersspanne lag bei 20 bis 83 Jahren mit einem durchschnittlichen Alter von 56 Jahren. Nach operativer Gewebeentnahme war das Material zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren worden. Durch Hämatoxylin- und Eosinfärbungen wurde jenes Gewebematerial identifiziert, welches mind. zu 60% aus Tumorzellen bestand. Die DNA- oder RNA-Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Blut- und Zellkultur DNA Kit, Qiagen, Hilden; RNeasy Kit s.o.).

Die Untersuchungen erfolgten auf der Basis eines positiven Ethikvotums (Studiennummer 2044).

2.2. Klonierung

2.2.1. Plasmide

Verwendet wurde der retrovirale Expressionsvektor S11IN (5797bp), der freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. H. Hanenberg (Klinik für Kinder-Onkologie, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt worden war (Plasmidkarte s. Anhang). Die Integration der DNA in das menschliche Genom wird bei diesem Vektorsystem durch flankierende retrovirale Long Terminal Repeat (LTR)-Sequenzen vermittelt. Der Replikationsursprung (ori) ermöglicht die Replikation in E.coli Bakterien. Desweiteren enthält dieser Vektor als prokaryontischen Selektionsmarker das Ampicillin-Resistenzgen (amp), das für die β -Laktamase kodiert sowie eine Multiple Cloning Site (MCS) vor der Internal Ribosomal Entry Site (IRES). Hier befinden sich verschiedene Restriktionsschnittstellen, anhand derer die CapG-Sequenz (1047bp) mithilfe des Restriktionsenzym EcoRI eingefügt werden konnte. Der virale CMV (Zytomegalie-Virus)-Promoter wurde als solcher verwendet, da er in Säugerzellen hohe Expressionen ermöglicht. Ein Neomycin-Resistenzgen (NeoR) im Vektor S11IN diente als eukaryontischer Selektionsmarker.

2.2.2. Bakterienstämme

Für die Plasmidamplifikation wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

DH5 α : F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR rec1 endA1 hsdR17
(rk-, mk+)phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1

- SURE:** e14- (McrA-) Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kanr) uvr[F'proABlacIqZ Δ M15 Tn (Tetr)]
- XL-1 Blue:** endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ (lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻m_K⁺)

2.2.3. Restriktionsanalyse von DNA

Die Restriktion der DNA wurde nach Angaben des Restriktionsenzym-Herstellers (Roche, New England Biolabs) durchgeführt. Sie dient der gezielten Herstellung von DNA-Fragmenten mittels spezieller Enzyme, deren ursprüngliche Funktion die bakterielle Abwehr von Fremd-DNA (viral) ist.

Für einen Ansatz (20 μ l) wurden 1 μ l Enzym, 0,5-1 μ g DNA und 2 μ l Reaktionspuffer (10x) in ein Reaktionsgefäß pipettiert, für 1 Stunde bei 37°C im Heizblock (Stuart Scientific) inkubiert und die Enzyme anschließend bei 65°C für 15 Minuten inaktiviert.

2.2.4. Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors

Dieser Schritt dient der Vermeidung unerwünschter Religierung der *sticky ends* an den Schnittstellen des linearisierten Vektors. Dazu wurde eine Alkalische Phosphatase (NEB, Bad Schwalbach) nach Angaben des Herstellers verwendet. Diese wurde mit dem Ansatz zunächst über 1Std. bei 37°C inkubiert und schließlich für 15min. bei 65°C inaktiviert.

2.2.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Elution der DNA nach Auftrennung im Agarosegel wurde das Plasmid Extraction Kit (Machery Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei wird das Gel aufgelöst und die DNA schließlich nach Bindung an eine Anionenaustauschersäule von dieser eluiert.

Im Vorfeld wurden die Banden unter UV-Licht steril aus dem mit Ethidiumbromid-Lösung gefärbten Gel herausgeschnitten, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und deren Gewicht bestimmt.

2.2.6. Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten in den S11-IN-Vektor wurde die T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim) verwendet. Für 20µl Gesamt-Reaktionsansatz wurden hierfür 1Unit (1µl) der Ligase mit den Reaktionspuffern des Herstellers vermengt. Dies entsprach einem molaren Verhältnis zwischen Vektor-DNA und Insert-DNA von 1:3. Entsprechend den Angaben des Herstellers von pGEM®-T easy (Promega, Mannheim) folgte eine Inkubation der Reaktionsansätze wahlweise 2 Stunden bei 4°C oder über Nacht bei 16°C und im Anschluss die Inaktivierung des Enzyms für 15min. bei 65°C.

Nach Ligation der Fragmente waren diese nun in Form von doppelsträngiger Plasmid-DNA in den Vektor S11-IN integriert und dieser konnte zur Transformation von E.coli verwendet werden.

2.2.7. Herstellung elektrokompetenter E.coli-Zellen

Der Herstellung elektrokompetenter DH5α- und SURE-Zellen ging die Anzucht in 5ml Vorkultur (LB-Medium und Ampicillin, 2µl/ml, 37°C) über Nacht voraus. Diese Vorkultur diente zur Animpfung von 500ml LB-Medium (bei 37°C unter Schütteln). Das Wachstum der Zellen wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600\text{nm}$ kontrolliert, bis diese bei einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,6$ geerntet werden konnten. Die Zellen wurden hierfür in Zentrifugenröhrchen überführt, 10min. auf Eis inkubiert und schließlich 15min. bei 4000g und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden zweimal mit eiskaltem dH₂O (500ml/ 250ml) gewaschen und ein weiteres Mal mit 10ml 10%igem Glycerin (in dH₂O). Nach Resuspension in 1,5ml Glycerin-Lösung (10%) wurden die Zellen auf Eis zu je 40µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.8. Elektroporation

Mit dieser Methode können Zellmembranen permeabilisiert werden, um auf diese Weise das Einbringen der DNA-Vektoren in die E.coli-Bakterien möglich zu machen (Transformation). Dies geschieht durch Anlegen eines elektrischen Feldes.

Für die Transformation mussten die elektrokompetenten E.coli-Zellen zunächst auf Eis aufgetaut, mit 1-2µl des Ligationsansatzes versetzt und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (Eurogentec, Köln) überführt werden. Der Vorgang selbst erfolgte mit

einem Gene Pulser (BioRad, München). Ein abfallender Spannungspuls bei 2,5kV, 25 μ F, 200 Ω und $\tau = 4,0$ sorgte für die Membranpermeabilisierung. Hiernach wurden die Zellen mit 1ml vorgewärmten SOC-Medium aus der Küvette gespült, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und in diesem für 1 Std. bei 37°C und 180rpm geschüttelt. Nach 5-minütiger Zentrifugation (1000rpm) konnte der Überstand abgenommen werden, resuspendiert und auf Agar-Platten mit Selektionsmedium ausgesät werden. Es folgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht. Die entstandenen Einzelkolonien wurden in je 4ml LB-Medium (inkl. Ampicillin) gegeben, über Nacht inkubiert (37°C unter Schütteln) und am Folgetag für die Plasmid-DNA-Isolierung geerntet.

LB-Medium:	10g Trypsin, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl, ad 1000ml dH ₂ O, pH 7,3
SOC-Medium:	2%Trypton, 0,5%Hefeextrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 10mM MgSO ₄ , 20mM Glukose
Agar-Platten:	LB-Medium + 2%Agar-Agar (50mg/l)

2.2.9. Plasmid-Präparation aus E.coli

Die Präparation von reiner Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen (4ml LB-Medium und 2 μ l/ml Ampicillin) erfolgte mit dem Plasmid-Isolation Kit (Machery Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers. Plasmide aus größeren Bakterienkulturen (Midi- bzw. Maxi-Präparation) wurden mit Hilfe des Endofree Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden), ebenfalls nach Angaben des Herstellers hergestellt.

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Zelllinien und Zellkultur

SK-OV-3:	Adenokarzinom, ATCC®-Nr. HTB-77
Hey:	Papilläres Zystadenom, ATCC®-Nr. CLU-302
Medium:	RPMI 1640 (GIBCO®, Invitrogen); enthält 2000mg/l D-Glucose Diesem wurden 1%L-Glutamin-Lösung (GIBCO®, Karlsruhe),

10%fötales Kälberserum (FCS Gold Mycoplex, PAA, Pasching) und 0,1%Gentamycin (10mg/ml; GIBCO®) zugefügt.

Die Kultivierung der Zelllinien in 250ml Gewebekulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) erfolgte in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau) unter standardisierten Bedingungen (37°C, 5%CO₂ und 95%Luftfeuchtigkeit) bis zu einer 70-90%igen Konfluenz. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden zunächst bei 37°C aufgetaut und in 50ml Zellkulturflaschen mit 5ml Medium überführt. Nach Stabilisierung der Zellen wurden diese in größeren Flaschen subkultiviert. Dazu wurde zweimal wöchentlich das Medium gewechselt und die Zell-Monolayer mit *phosphate buffered saline* (PBS Dulbecco; Invitrogen, Karlsruhe) gewaschen.

Bei 70-90%iger Konfluenz wurden die Zellen gelöst und in neue Kulturflaschen eingesät. Dafür wurde das Medium verworfen, die adhärenenten Zellen einmal mit PBS gewaschen und schließlich mit 1%Trypsin bei 37°C im Brutschrank inkubiert bis alle Zellen gelöst waren. Mit einer äquivalenten Menge Medium wurde die Trypsinlösung anschließend verdünnt und die Suspension in Zentrifugenröhrchen (Greiner) für 5min. bei 1000rpm abzentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus). Je nach Größe des Pellets wurde dieses in 1 bis 3ml Medium resuspendiert, eventuell ausgezählt und zuletzt in eine neue Flasche ausgesät.

2.3.2. Bestimmung der Zellzahl

Dafür wurde die Zellsuspension in einer 1:1 Verdünnung mit Trypanblau-Lösung gefärbt und mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Zellzahlen von je vier großen Quadraten inklusive linkem und oberem Rand lieferten die Zellzahl nach folgender Formel:

$$\frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Fläche(mm}^2\text{) x Kammertiefe(mm) x Verdünnung}} = \text{Zellen/}\mu\text{l}$$

2.3.3. Kryokonservierung

Um Zellen in flüssigem Stickstoff einfrieren zu können, wurden diese zunächst gewaschen, mit Trypsin gelöst und zentrifugiert. Nach Resuspension in 1ml Medium erfolgte die Zugabe von 10%DMSO in einem 2ml Kryoröhrchen (Greiner). Um einen schonenden Gefriervorgang zu ermöglichen, wurden die Röhrchen zunächst bei -20°C, anschließend bei -80°C eingefroren und zuletzt in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.3.4. Stabile lentivirale Transfektion

Die lentivirale Transfektion von Zellen führt zu einer stabilen Expression eines Gens. Ein Virus ohne gag-, pol- und env-Sequenz (d.h. nicht mehr replikationsfähig, aber weiterhin infektiös), der das zu transfizierende Gen in Form einer Expressionskassette enthält, wird zunächst in eine Verpackungszelllinie (Phoenix-Zellen) eingebracht. In den Zellen wird die retrovirale Vektor-RNA mittels Reverser Transkriptase in DNA umgeschrieben, in das Wirtsgenom integriert und somit vervielfältigt. Die entstandenen rekombinanten Lentiviren werden dann zur Transfektion der Zelllinie verwandt.

Der CapG-Vektor S11-CapG-R-IN (Selektionsmarker Neomycin) sollte die CapG-Expression der Zelllinie Hey stabil steigern.

Um eine ausreichende Menge von Plasmid-transfiziertem Virus zu erhalten, wurden zunächst EcoR-Phoenix-Zellen in mit 0,1% Gelatine beschichteten 10cm Zellkulturflaschen ausgesät ($4,5 \times 10^6$ Zellen) und über 24 Stunden inkubiert. Daraufhin erfolgte ein Vollmedium-Wechsel und die Transfektion mit dem Expressionsplasmid S11-CapG-R-IN (Plasmidkarte siehe Anhang) mit Hilfe des FuGENE™-6-Transfektionsreagenzes (Roche): Ein Gemisch aus 200µl DMEM-Medium, 60µl Transfektionsreagenz und 15µg Plasmid wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. 48 Stunden später wurde der Zellüberstand mit den produzierten Viren abgenommen und sterilfiltriert durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,45µm. Mit dem Filtrat wurden die Zellen abermals infiziert und unter Zugabe von Neomycin (Geneticin®, Invitrogen) selektiert. Weitere 48 Stunden danach erfolgte erneut eine sterile Filtration und mit diesem Überstand wurden Zellen der Zelllinie Hey infiziert. Diese waren zuvor in Sechsllochplatten (ThermoScientific) für 24 Stunden kultiviert worden und es erfolgte eine Virustransfektion mit je 1ml Virus-Überstand pro Well. Zur Selektion der transfizierten Zellen wurde in den folgenden ca. 7 Tagen das Medium (RPMI1640) mit Neomycin versetzt. Die erfolgreiche Selektion konnte an den Kontrollzellen gemessen

werden, die nicht transfiziert worden waren und dementsprechend nicht Neomycin-resistent waren.

Die Transfektion wurde im S2-Labor mit Frau Dr. Constanze Wiek (Arbeitsgruppe Prof. Hanenberg, Klinik für Kinder-Onkologie, Düsseldorf) durchgeführt.

2.3.5. RNA-Interferenz

Ein Verfahren, um die Proteinbiosynthese eines bestimmten Zielgens zu unterdrücken ist das des dsRNA-induzierten *gene silencing*, auch RNA-Interferenz genannt. Der zugrundeliegende Mechanismus hat sich in eukaryontischen Zellen vermutlich als Abwehrmechanismus gegen Viren und artfremde Gene entwickelt [Paddison and Hannon 2002]. Dabei wird die transfizierte doppelsträngige RNA in der Zelle zu kleinen Duplex-dsRNA zerschnitten. Diese siRNA-Moleküle (*small interfering RNA/ silencing RNA*) führen dann zu einer Degradation derjenigen mRNA, die eine homologe Sequenz aufweist [Elbashir et al. 2001]. Eine Proteinsynthese ist somit nicht mehr möglich.

Für die siRNA-Transfektion wurden Zellen (Konzentration 5×10^4 Zellen/Well in je 2ml Medium ohne Zusätze) 24 Stunden vor der Behandlung in Sechslachplatten ausgesät.

Für den Ansatz wurde je 6µl verdünnte (1:20 siRNA / RNase freies Wasser) -12,5nM-siRNA (Ambion,UK) und 12µl HiPerfect-Transfektionsreagenz (Qiagen, Hilden) mit 182µl zusatzfreiem Medium verdünnt, d.h. insgesamt 200µl, und über ca. 10min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Transfektion der siRNA-Moleküle erfolgte tröpfchenweise unter konstantem Bewegen der Platten.

Die Proben wurden jeweils über einen Zeitraum von 5 Tagen inkubiert und schließlich geerntet und entweder bei -20°C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Gen	siRNA-Sequenz
CapG	GGUGGUGUGGAGUCAGCAU

Tab. 2.6 siRNA-Sequenz

2.3.6. IGF2 - Stimulation

Zur Vorbereitung der Zellen wurden diese geerntet, in Sechslachplatten ausgesät und für 48 Std. bis zu einer etwa 60%igen Konfluenz wachsen gelassen. Hiernach wurde das Vollmedium verworfen und über 3Std. durch wachstumsfaktorfreies Medium ersetzt. Dies sollte das Vorliegen freier Ligandenbindestellen gewährleisten. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von IGF2-Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen: 1, 10, 50 und 100ng/ml. Der Wachstumsfaktor wurde dafür jeweils in zusatzfreiem Medium verdünnt.

Nach 2- bzw. 26-stündiger Inkubation der Zellen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit wurden diese geerntet, das Pellet mit PBS gewaschen und entweder bei -80°C gelagert oder direkt für die Isolation von RNA verwendet.

2.4. Invasionsassay

2.4.1. Matrigel® Invasionsassay (BD Biocoat)

Das Prinzip des Assays beruht auf der Migration von potenziell malignen Tumorzellen durch eine mit BME(Basement Membrane Extract)-beschichtete Membran. Diese lösliche Schicht wurde aus einem Engelbreth-Holm-Swarm(EHS)-Sarkom der Maus extrahiert, einem Tumor reich an extrazellulären Matrixproteinen. Darunter zum Beispiel Laminin, Kollagen IV, Heparan-Sulfat-Proteoglykanen und Entaktin/Nidogen. Andere im Tumor befindliche Proteine wie TGF- β , EGF (Epidermal growth factor), IGF (*Insulin like growth factor*) sowie weitere Wachstumsfaktoren und Aktivatoren sind ebenfalls in der Matrix enthalten. Diese Zusammensetzung soll die Basalmembran *in vitro* darstellen und eine Durchwanderung derselben ist dementsprechend Hinweis auf eine potenzielle Malignität der Tumorzelle.

Die Durchführung des Assays erfolgte mit den BD Biocoat® Matrigel™ Invasionskammern der Firma BD Biosciences. Die Kammern enthalten Polykarbonatfilter (Membranen) mit 8 μ m großen Poren, die von invasiven Zellen durchwandert werden können. Eine solche Kammer befindet sich jeweils in einem Loch der 24-Loch-Multiplatten (Cellstar®, Greiner Bio-one) und die Zellbewegung wird durch einen Wachstumsfaktorgradienten im Medium der Zellen ober- und unterhalb der Membran stimuliert. Als chemischer Lockstoff diente hierbei EGF in einer Konzentration von 15ng/ml.

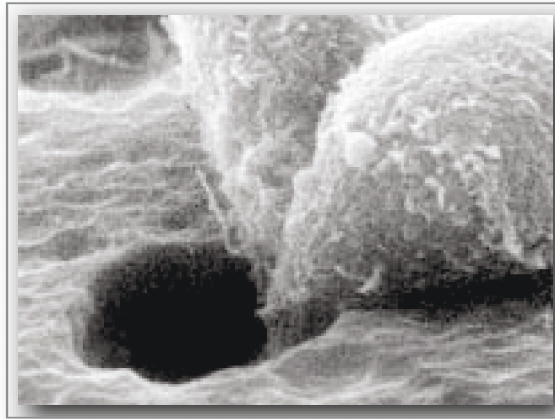


Abb. 2.3 Elektronenmikroskopischer Scan zweier Fibrosarkomzellen, die die schützende Matrix verdaut haben und nun die 8µm grossen Membran-Poren durchwandern (BD Biosciences, Kanada)

Zunächst wurden Zellen am Vortag passagiert (s. Kapitel 2.3.1.) und in Sechsl Lochplatten eingesät, um einen guten Zellzustand zu garantieren. Diese wurden nach 24 Stunden erneut trypsinisiert und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt (s. Kapitel 2.3.2.). Die entsprechende Menge Zellsuspension wurde auf eine Konzentration von 5×10^4 Zellen/ml mit Medium ohne Zusätze verdünnt und 500µl davon jeweils in die Kammern des Invasionsassays pipettiert. Entsprechend den Angaben des Herstellers waren die Kammern zuvor aus -20°C aufgetaut worden und 2 Stunden mit zusatzfreiem Medium rehydriert worden (bei 37°C).

In die Löcher der 24-Loch-Platten unterhalb der eingesetzten Kammer mit Zellsuspension wurde 750µl Vollmedium mit EGF-Zusatz (15ng/ml) gegeben.

Anschließend erfolgte eine Inkubation der Kammern für 22-23 Stunden bei 37°C und 5%CO₂-Atmosphäre.

Für die Auswertung am Folgetag wurde die Kammer zunächst vollständig für 2 Minuten in Methanol fixiert, um ein vorzeitiges Lösen der invadierten Zellen von der Membranunterseite durch Manipulation von außen zu verhindern. Danach konnte das Medium im oberen Kompartiment angesaugt und verworfen werden, um Zellen auf der Oberseite der Membran mit Wattestäbchen vorsichtig entfernen zu können. Eine weitere Fixation in Methanol für 2min. und die 2-minütige Färbung mit Toluidinbfärbelösung (0,1%Toluidinblau, 0,1%Natriumborat auf 10ml dH₂O) wurden von 2 Waschschritten in destilliertem Wasser und anschließender Lufttrocknung gefolgt.

Die gefärbten Membranen konnten dann mit einem Skalpell aus der Kammer herausgeschnitten und mit Immersionsöl (Zeiss) auf Objektträger aufgetragen werden. Die Invasivität der Zellen ließ sich durch Auszählung der Zellen auf der Membran ermitteln.

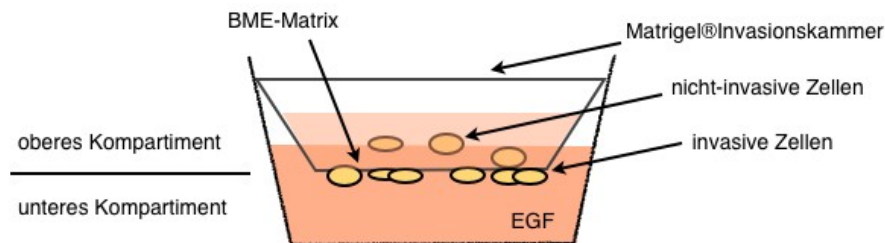


Abb. 2.4 Schemazeichnung des Invasionsassay Matrigel

2.4.2. Scratch Assay (Migrationsassay)

Der Scratch Assay ist ein besonders einfaches und günstiges Verfahren, um das Wanderungsverhalten von Zellen vor und nach Transfektion mit dem Plasmid S11-CapG-R-IN, bzw. nach Behandlung mit siRNA visuell sichtbar zu machen und zu evaluieren [Liang et al. 2007].

Dazu wurden Zellen zunächst nahezu 100%ig konfluent in Sechslachplatten kultiviert. Nach Entfernen des Mediums wurde zunächst eine Referenzlinie auf die Plattenrückseite gezeichnet, um die Dokumentation des *scratches* möglich zu machen und zu standardisieren. Der Kratzer selbst erfolgte durch Anlage einer sterilen 200µl Pipettenspitze an einen sterilen Objektträger. An diesem entlang wurden pro Loch drei Kratzer gesetzt, möglichst in gleicher Strichstärke, Zugschnelligkeit und -winkel. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Kratzer einzeln unter dem Mikroskop auf Gleichartigkeit untersucht und dokumentiert, um nicht falschen Schlüssen durch unterschiedlich breite Kratzer zu erliegen.

Im Durchschnitt wurden die Zellen 2 Tage wachsen gelassen, bis mindestens eine Linie zugewachsene *scratches* zeigte: Hey/ Hey+S11-CapG-R-IN ca. 3 Tage (Zusätze im Medium auf Hälfte reduziert, um Zellteilungseffekte zu minimieren); SK-OV-3/ SK-OV-3+siRNA nur 2 Tage (in Vollmedium).

Die Zellen wurden daraufhin 2 Minuten mit Methanol fixiert und 2 Minuten in Toluidinblau-Färbelösung (s. Kap. 2.4.1.) gefärbt und anschließend unter dem Mikroskop (Carl Zeiss; Axiovert) ausgewertet. Die horizontale Linie diente als Referenz, in deren Umgebung die Kratzer die größtmögliche Ebenmäßigkeit aufwiesen und daher für den Vergleich verwendet werden konnten. Die Aufnahme und Bildbearbeitung erfolgten mit der AxioVision Software von Zeiss.

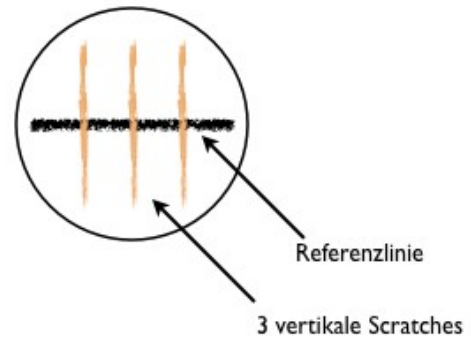


Abb. 2.5 Scratch Assay Schema; ein Loch mit 90-100%konfluenten, adhärennten Zellen wurde zunächst horizontal auf der Plattenunterseite markiert und anschließend drei möglichst gleichartige *scratches* vertikal dazu gesetzt (200µl Pipettenspitze).

2.5. Proteinanalytische Methoden

2.5.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Extraktion von Gesamtprotein aus Zellen wurde das Zellpellet zunächst mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 50-250µl eisgekühltem Lyse-Puffer aufgenommen und 30min. auf Eis stehen gelassen. Der Lyse-Puffer (50nM Tris, 150mM NaCl, 1%Triton X-100, auf 100ml dH₂O aufgefüllt) war zuvor bei -20°C gelagert worden und wurde nach dem Auftauen mit einer 1%igen Proteaseinhibitor-Lösung versetzt (Roche, Mannheim).

Im Anschluss wurde das Lysat für 30min. bei 4°C und 13800rpm zentrifugiert. Der Überstand, die Zellproteine enthaltend, wurde in ein neues Gefäß überführt und für die Bestimmung der Proteinmenge verwendet.

2.5.2. Subzelluläre Fraktionierung

Zur Vorbereitung auf die Fraktionierung wurden Zellpellets mit PBS gewaschen und dieses danach vollständig abgenommen. Um nach Aufschluss der Zellen eine zytosolische von einer nukleären Proteinfraction unterscheiden zu können, wurden die Pellets zunächst vorsichtig in ca. 200µl HB-Puffer (10mM Tris-HCl, 10mM KCl, 1,5mM

MgCl₂, 0,5mM β-Mercaptoethanol, pH 7,4, 4μl/ml Proteaseinhibitor) aufgenommen, 5min. auf Eis stehen gelassen und anschließend 5min. bei 4°C und 1200rpm (=150g) zentrifugiert. Das Pellet der angeschwollenen Zellen wurde in 100 bis 150μl Lyse-Puffer (HB-Puffer+0,4%NP-40) resuspendiert und das Pellet aufgelöst. Nach 10min. Inkubation auf Eis und minütlichem Schütteln wurden die Suspensionen erneut für 5min. (4°C, 13800rpm) zentrifugiert. Dieser Vorgang führte zum Aufschluss der Zellen und der Überstand war dementsprechend das Lysat der zytoplasmatischen Proteinfraction (C). Das nach Abnahme dieser Fraktion übrig gebliebene Pellet wurde erneut in Lyse-Puffer gewaschen, 5min. auf Eis ruhen gelassen und dabei regelmäßig invertiert. Es folgte die Zugabe des C-Puffers (20mM HEPES, 400mM NaCl, 1nM EDTA, 1mM DTT, pH 7,4, 4μl/ml Proteaseinhibitor), der die Kernmembran aufschließt. Eine letzte Zentrifugation für weitere 5min. (4°C, 13800rpm) lieferte die nukleäre Proteinfraction (N). Das Pellet, bestehend aus den Kernhüllen, wurde verworfen.

Die beiden Proteinfractionen (C/N) wurden anschließend mit dem Bradford-Test quantifiziert.

2.5.3. Proteinbestimmung

Bei der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Seitenketten der Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 470 auf 595nm. Diese Eigenschaft macht sich der Bradford-Test zunutze, bei dem der Proteingehalt einer Probe anhand seiner Extinktion bei 595nm Wellenlänge quantifiziert werden kann.

Dafür wurden Proteinlysate direkt nach der Extraktion verwendet und 1:5 mit dH₂O verdünnt. Nach Zugabe von je 1ml Bradford-Reagenz (Quick Start™ Protein Assay Kit; BioRad, München) zu den in Duplikaten gemessenen Proben wurden diese 10min. bei RT inkubiert. Im Vorfeld der Proteinbestimmung diente die Extinktion von RIPA-Puffer (inkl. Proteaseinhibitor) als proteinfreie Kontroll-Lösung. Die Extinktionsmessungen erfolgten bei 595nm in einem Spektrophotometer (DU®-64-Spektrophotometer, Beckmann).

Zur Berechnung des absoluten Proteingehalts der Proben anhand der Extinktionswerte wurde folgende Formel verwendet:

$$P_{\text{Ges}} = (2,2984 \times E - 0,0591) \times 5$$

2.5.4. SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die Durchführung der Natriumdodecyl (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Laemmli [Laemmli 1970]. Hierbei werden Proteine nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt, wobei die Eigenladung der Proteine größenspezifisch durch das anionische Detergenz SDS überlagert wird.

Zunächst wurden die Proben jeweils im Verhältnis 1:5 mit SDS-Probenpuffer für 10min. je nach Größe des aufzutrennenden Proteins bei 95°C (CapG) oder für 10min. bei 65°C (Ank3) im Heizblock (Stuart Scientific, UK) denaturiert, zentrifugiert und entweder sofort auf ein Gel aufgetragen oder bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Die unterschiedlich konzentrierten Gele wurden in der ProteinII-Apparatur (BioRad, München) hergestellt. Wurde die SDS-PAGE als zweite Dimension der 2D-Gelelektrophorese durchgeführt, so wurde auf ein Sammelgel verzichtet.

Trenngel				Sammelgel
Ansatz	6 %	12 %	12%(groß) für 2D	
40%Bis-Acrylamid	2,25ml	4,5ml	6,75ml	0,5ml
Trenn-/ Sammelgel-Puffer	5,6ml	5,6ml	8,4ml	625µl
10%SDS	150µl	150µl	225µl	50µl
dH ₂ O	6,85ml	4,6ml	6,9ml	3,8ml
10%APS	120µl	120µl	180µl	25µl
TEMED	12µl	12µl	18µl	5µl

Tab. 2.7 Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE

Für die Auftrennung wurden je 15µg denaturiertes Protein in Lämmli-puffer verdünnt aufgetragen. Als Vergleichsgröße wurde der Größenstandard SeeBlue® Plus2 Prestained-Standard (Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Die Minigel-Elektrophorese erfolgte über 1,5 - 2Std. bei 80V in den ersten 10min. und anschließend 100V mit Hilfe eines Spannungsgerätes (PowerPac 300 Power Supply; BioRad, München). Das Gel befand sich dabei vollständig in SDS-Equilibrierungspuffer.

Lämmli-Puffer (6x) :	2% SDS (10%), 10%Glycerin, 5% β -Mercaptoethanol, 0,002%Bromphenolblau (1%), 1M Tris (62,6g), ad 10ml H ₂ O
Trenngel-Puffer:	60,57g (1M) Tris, ad 500ml H ₂ O, pH 8,8
Sammelgel-Puffer:	60,57g (1M) Tris, ad 500ml H ₂ O, pH 6,8
SDS-Equilibrierungspuffer:	25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1%SDS (10%), ad dH ₂ O

2.5.5. Western Blot und immunologische Detektion

Bei diesem Verfahren, das auf Edwin Southern, den Erfinder der Blotting-Technik zurückzuführen ist, werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond; GE Healthcare, Freiburg) transferiert, auf der sie schließlich durch Antikörperbindungen spezifisch nachgewiesen werden können.

Der Protein-Transfer erfolgte gekühlt im Nass-Blot-Verfahren, wofür Transferpuffer verwendet wurde.

Zunächst wurden je 6 Filterpapiere, Membran und Gel im Puffer für 10min. inkubiert. Je nach Dicke des Gels und Größe des Proteins wurde eine Spannung von 100V für 45-75min. angelegt. Dabei galt das Prinzip: Je dicker oder größer das Protein, desto länger die Transferdauer. Im Anschluss erfolgte eine Kontroll-Färbung der Nitrocellulose-Membran mit Ponceau S-Lösung (Sigma Diagnostics®, München) und die Entfärbung mit destilliertem Wasser.

Transferpuffer: 25mM Tris, 192mM Glycin, 20%Methanol

Vorbereitend für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Dafür wurde diese über mind. 45min. bei RT mit Western Blocker Solution (Sigma, München) abgedeckt.

Es folgte die Inkubation der Membran über Nacht mit den Erstantikörpern (s. Tabelle 2.8) bei 4°C auf einem Schüttler. Die Membranen wurden danach 3mal kurz und 3mal über 10min. mit 0,1%TBS-T gewaschen und anschließend über 90min. mit einem Zweitantikörper bei RT inkubiert. Diese sind an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP-*horseradish peroxidase*) gekoppelt und führen bei der Immunodetektion durch Oxidation von Luminol (ECL Western Blotting Detection Kit; GE Healthcare, Freiburg) zu einer

detektierbaren Lumineszenz. Vor der Detektion wurden die Membranen erneut 3mal kurz und lang gewaschen.

TBS: 10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 8,0

TBS-T: TBS + 0,05%Tween 20 (Sigma-Aldrich)

Erstantikörper	Verdünnung	Zweitantikörper	Verdünnung
α- CapG, rabbit IgG	1:2500	α-rabbit IgG, gekoppelt mit Merrettich-Peroxidase	1:2500
α- Tubulin, rabbit IgG	1:4000	α-rabbit IgG, gekoppelt mit Merrettich-Peroxidase	1:4000
α- GAPDH, goat IgG, polyklonal (sc-48166)	1:1000	Rabbit; α-goat IgG, gekoppelt mit Merrettich-Peroxidase	1:2500
α- Histone3, goat IgG, polyklonal (sc-8644)	1: 2000	Rabbit; α-goat IgG, gekoppelt mit Merrettich-Peroxidase	1:2500
α- Ank3, mouse IgG	1:500	α-mouse IgG, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase	1:4000

Tab. 2.8 Erst- und Zweitantikörper für die Immunodetektion

Für das Sichtbarmachen der Antikörperbindungen durch Chemilumineszenz wurden die Membranen zunächst kurz zwischen Filterpapier getrocknet und 1min. mit Luminol bei RT inkubiert und erneut leicht getrocknet. Die Exposition erfolgte zwischen Kopierfolien in einer Detektionskassette und wurde in der Dunkelkammer durchgeführt. Die Expositionszeit der eingelegten Filme (Hyperfilm; GE Healthcare, Freiburg) variierte zwischen 0,5-2min. Diese wurden anschließend so lange in Entwickler-Lösung (Kodak) eingelegt, bis Standard und Banden deutlich und differenziert erkennbar waren, gewaschen, fixiert (Fixier-Lösung; Kodak) und getrocknet. Das Resultat konnte dann eingescannt und ausgewertet werden.

2.5.6. Proteinpräzipitation

Im Rahmen der 2D-Gelelektrophorese wurden Proteine durch TCA/Aceton-Fällung gefällt und konzentriert. Dazu wurde je 12% eiskühlte Trichloressigsäure (TCA, -20°C) zu der Protein-Lösung gegeben, wobei sich diese je nach Proteinmenge weiß verfärbte. Nach mind. 30min. Inkubation bei RT wurde das Gemisch bei 13800rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand anschließend abgenommen. Das Pellet konnte dann in eiskühlem Aceton (250µl) für 30min. auf Eis gewaschen werden, hierbei wurde in regelmäßigen Abständen geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation (13800rpm, 4°C) wurde das Proteinpellet entweder direkt für die 2D-Gelelektrophorese verwendet oder bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5.7. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Diese Technik ermöglicht eine besonders hohe Auflösung bei der Auftrennung von Proteinen. Verantwortlich dafür ist die Kombination von Isoelektrischer Fokussierung (IEF), bei der Proteine bezüglich ihres isoelektrischen Punktes aufgetrennt werden, und SDS-PAGE.

Zunächst werden die nach Präzipitation konzentriert vorliegenden Proteinpellets mit 360µl Probenpuffer (enthält IPG zur Erstellung eines pH-Gradienten) versetzt und 1Std. unter Schütteln in diesem vollständig aufgelöst. Darauf folgt die Rehydratation der Polyacrylamid-Gelstreifen (Immobiline™ DryStrip, pH 4-7, 18cm; GE Healthcare, Freiburg) in einem Tray für ca. 19Std. bei RT mit dem Protein-Puffer-Gemisch. Die Strips wurden hierfür blasenfrei auf die Suspension gelegt und anschließend mit Mineralöl (CoverFluid; GE Healthcare, Freiburg) überdeckt.

Der Rehydratation folgte die isoelektrische Fokussierung über Nacht bei 20°C mit dem PowerSupply der Firma Bio-Rad. Hierfür wurden die Proteine nach einem festen Programm über ca. 14 Stunden aufgetrennt (s. Tab. 2.9). Im Anschluss wurden die Strips entweder direkt equilibriert oder bei -20°C gelagert.

Die Equilibrierung der Strips erfolgte bei RT und unter Schütteln für 15min. mit je 7,5ml Equilibrierungspuffer und 75mg Dithiothreitol (DTT; Sigma Alderich, München) und für weitere 15min. mit je 7,5ml dieses Puffers mit 187,5mg Iodoacetamid (IAA; Sigma-Alderich, München). Danach erfolgte die SDS-PAGE der auf 7cm gekürzten Streifen mit 12%igem Mini-Gel (s. Tab 2.7) über ca. 1,5Std., wobei 1,5%ige mit Bromphenolblau

gefärbte Agarose zur Fixierung dieser diente. Der Western Blot Analyse über 75min. folgte eine immunologische Detektion.

Schritt	Spannung (V)	Anstieg	Zeit (h)
1	0-500	Linear	0:01
2	500		6:00
3	500-3500	Linear	1:30
4	3500		7:00
5	3500-500	Linear	0:30

Tab. 2.9 Ablauf der Isoelektrischen Fokussierung

Probenpuffer:	7M Urea, 2M Thiourea, 2%CHAPS, 0,002%Bromphenolblau + Zugabe von 5mg DTT und 12µl IPG-Puffer pro 800µl Aliquot
Equilibrierungspuffer:	6M Urea, 75mM Tris-HCl (pH 8.8), 29,3% Glycerol, 2% SDS, 0,002% Bromphenolblau + Zugabe von 10mg/ml DTT oder 25mg/ml IAA

2.5.8. Immunzytochemie

Diese Methode ermöglicht die Anfärbung eines oder mehrerer Proteine in intakten, fixierten Zellen. Dafür wurden die frisch geernteten und in Vollmedium resuspendierten Zellen (s. Kapitel 2.3.1.) auf einem mit Ethanol gesäuberten Objektträger (OT) über Nacht kultiviert. Um eine ausreichende Luftfeuchte zu garantieren, wurden die OT in Petrischalen mit feuchten Tüchern gelagert. Nach 24Std. konnte das Medium abgegossen und die Zellen 3mal mit PBS gewaschen werden. Danach erfolgte die Fixierung für 6min. mit eisgekühltem Methanol und für 30Sek. mit eisgekühltem Aceton. Die OT wurden bis zur immunologischen Behandlung in Feuchtkammern kühl gelagert. Vor dem Antikörper-Nachweis wurden die Zellen über 10min. mit Abdecklösung (Westernblocker Solution; Sigma, München) überschichtet und mit PBS und 1%Triton™ X-100 gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe des Erstantikörpers (s. Tab 2.10) über Nacht bei 4°C oder für 2-3Std. bei RT. Nach einem Waschschrift von 3mal 10min. mit PBS wurden die OT in der Feuchtkammer für 2Std. bei RT mit dem Zweitantikörper

inkubiert. Als Ausbleichschutz wurde im Anschluss FluoCare (Carl Roth, Karlsruhe) aufgetragen und die OT dunkel, feucht und kühl gelagert.

Erstantikörper	Verdünnung	Zweitantikörper	Verdünnung
α -CapG, rabbit IgG	1:200	α -rabbit IgG gekoppelt mit Rhodamin	1:300
DAPI	0,1mg/ml		

Tab. 2.10 Erst- und Zweitantikörper für die Immunzytochemie

Eine Anfärbung allein der Zellkerne wurde mit Hilfe von 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) erzielt. 1 μ l der Stammlösung (1mg/ml) wurde verdünnt in 1ml dH₂O und die zellbewachsenen OT für 5min. dunkel, feucht und bei RT damit inkubiert. Dem Waschen mit PBS folgte die Zugabe von Ausbleichschutz und die dunkelfeuchte Lagerung der OT bis zur Darstellung der Fluoreszenz.

Die Auswertung der immunzytochemischen Behandlung erfolgte durch UV-Licht mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert; Carl Zeiss) und der AxioVision Software (Zeiss).

3. Ergebnisse

3.1. CapG wird im Ovarialkarzinom überexprimiert

Die Tatsache, dass CapG in verschiedenen Tumorentitäten (u.a. Mamma-Ca) als Onkogen mit tumorassoziierter Überexpression identifiziert worden ist, legt die Frage nahe, inwieweit dieses Aktin bindende Protein auch im Ovarialkarzinom überexprimiert wird. Die Expressionsanalyse von 30 Tumorgewebsproben aus Ovarialkarzinomen (entnommen zwischen 1994 und 1999 in der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf) mittels quantitativer Real-time PCR zeigte eine Überexpression (definiert als >2,1-fach und damit oberhalb der Standardabweichung in Bezug auf den Durchschnitt der Kontrollproben) in 9/30 Fällen (30%). Dabei wurde CapG im Tumorgewebe im Gesamtdurchschnitt 2-fach höher exprimiert als in den Normalgewebsproben.

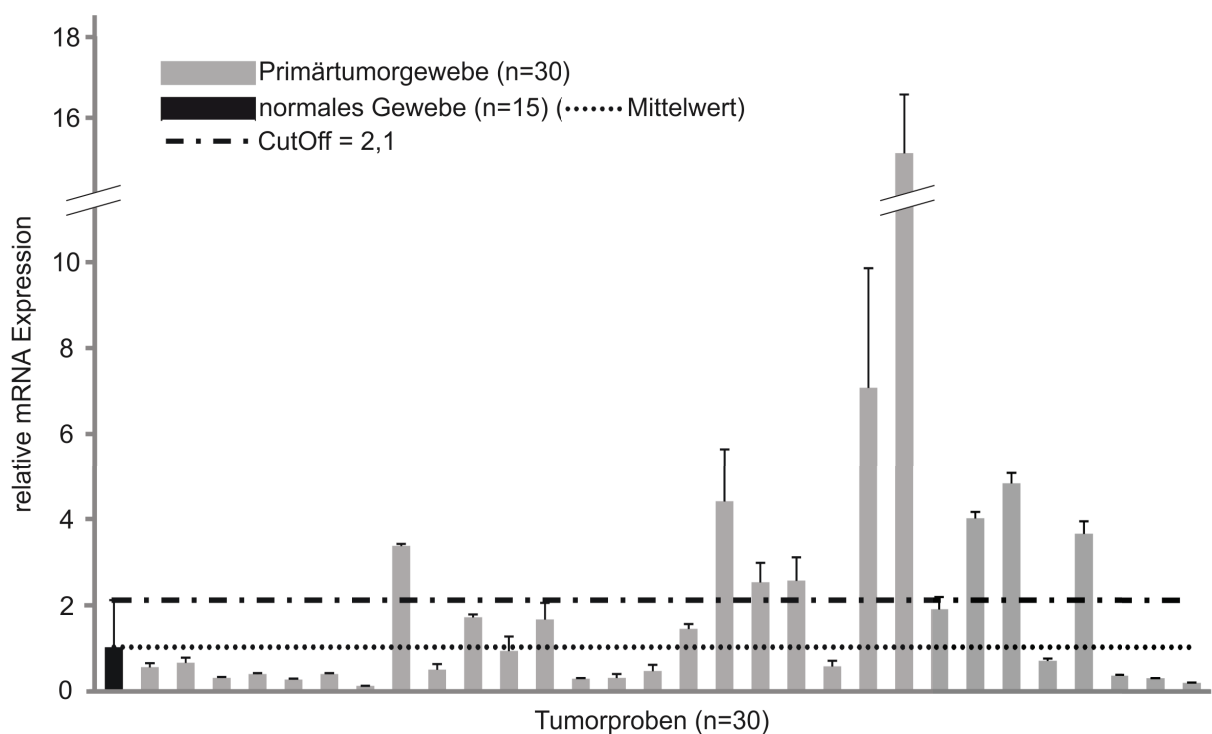


Abb. 3.1 Relative Expression von CapG in Ovar-Tumorgewebe (n=30) im Vergleich zu Ovar-Normalgewebe (n=15); dargestellt sind relative mRNA-Expressionswerte normiert auf das *housekeeping*-Gen GAPDH in Relation zur durchschnittlichen Expression bei Normalproben (=1, schwarz). Der CutOff für CapG-Überexpression liegt entsprechend der Standardabweichung der Normalproben bei 2,1 (gestrichelte Linie), überexprimierende Tumorproben n=9/30 (30%).

3.2. CapG-Expression in den Ovarialkarzinom-Zelllinien SK-OV-3 und Hey

Die Überexpression gab Anlass zu tiefergehenden Analysen von CapG und seiner potenziell onkogenen Funktion. Im Folgenden sollten nun zwei Zelllinien dazu dienen, ein stabiles System für die Untersuchung der Auswirkungen dieser Expressionsveränderung zu bilden.

In komparativen Real-time PCR Analysen konnte eine um 14,89-fach höhere CapG-Expression in SK-OV-3 Zellen gegenüber Zellen der Linie Hey gezeigt werden. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode. GAPDH diene als Kontrollgen (=1), auf das sich alle ermittelten Ct-Werte beziehen.

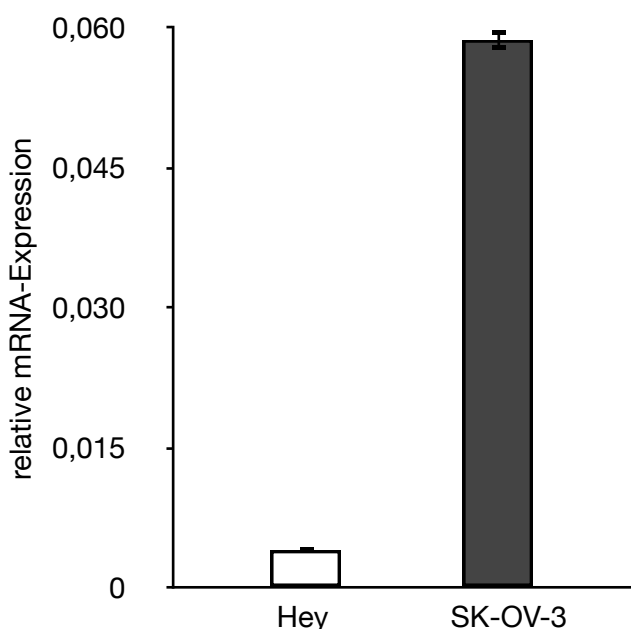


Abb. 3.2 Relative Expression von CapG in den Zelllinien Hey und SK-OV-3

Bezugsgröße ist das *housekeeping*-Gen GAPDH; SK-OV-3 exprimiert CapG 14,89-fach höher als Hey

Tab. 3.1 Expressionsdaten von CapG-mRNA mit Real-time PCR (rel. zu GAPDH)

Zelllinien	Hey	SK-OV-3
$2^{-\Delta C_t}$	0,0039	0,0586

3.3. Invasivität der Ovarialkarzinom-Zelllinien SK-OV-3 und Hey

Bislang unaufgeklärt ist die Frage, welchen funktionellen Einfluss erhöhte CapG-Expression in diesen Tumoren ausübt. In Mammakarzinomen konnte gezeigt werden, dass vermehrtes CapG mit Invasivität korreliert (N.Seier, 2009). Zum Vergleich des Einflusses von CapG auf die Invasivität in ovarialen Tumoren wurden zwei Ovarialkarzinom-Zelllinien ausgewählt, die sich im Expressionsmuster und anhand ihres Invasionspotenzials unterscheiden. Diese wurden modellhaft zur Analyse von CapG beim Ovarialkarzinom verwendet.

Die Invasivität der beiden Zelllinien wurde mit dem Invasionsassay Matrigel® (BD Biocoat) untersucht. Invasivität lässt sich in diesem Assay durch die Anzahl der Zellen ermitteln, die eine BME(Basement Matrix Extract)-beschichtete Membran durchwandern. Diese ist das Korrelat der Basalmembran *in vivo* und damit Invasionsbarriere des Tumorwachstums.

Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede im invasiven Potenzial. Bei der niedrig CapG-exprimierenden Zelllinie Hey (Abb. 3.4) durchwanderten signifikant weniger Zellen die BME-Matrix als dies bei SK-OV-3 (Abb. 3.3) Zellen der Fall war. Hieraus ergab sich die Frage, ob die unterschiedliche CapG-Expression ursächlich für die unterschiedliche Invasivität war.

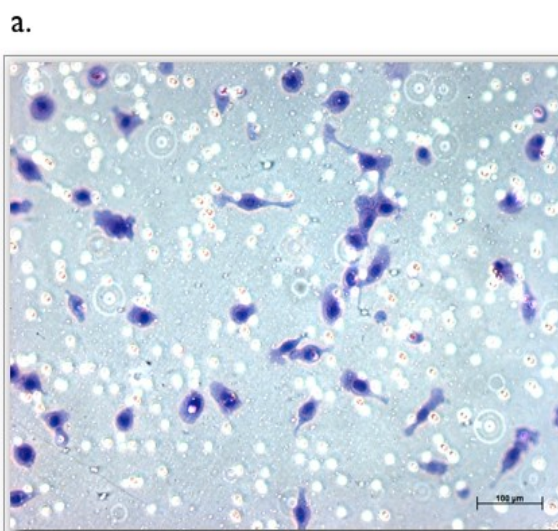


Abb. 3.3 Zelllinie SK-OV-3; viele Zellen haben die Matrix durchwandert

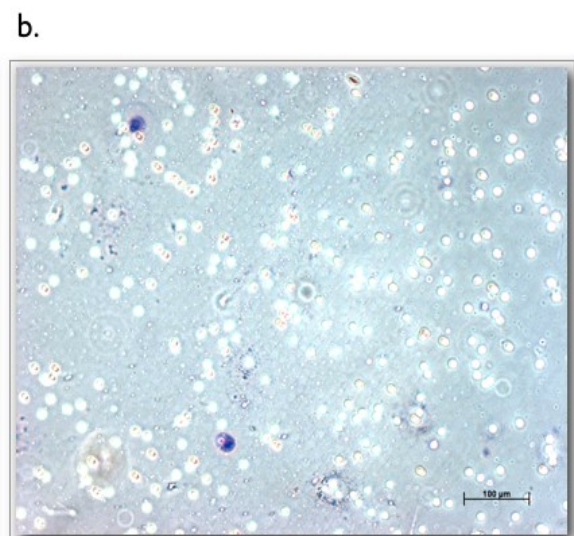


Abb. 3.4 Zelllinie Hey; kaum Zellen durchdringen die BME-Matrix

Der schwarze Balken entspricht jeweils einer Distanz von 100µm.

3.4. Modulation der CapG-Expression

Erhöhte CapG-Expression beeinflusst das Invasionspotenzial in Mammakarzinomen [Van den Abbeele et al. 2007; Renz et al. 2008], in Pankreaskarzinomen [Thompson et al. 2007] sowie diversen anderen Tumoren. Diese Postulate gaben Anlass dazu, auch im Ovarialkarzinom eine solche Korrelation zwischen CapG-Expression und Invasivität bzw. Migrationspotenzial zu suchen.

Um ein stabiles, vergleichbares Versuchssystem herzustellen (geringe Störanfälligkeit, Gleichbehandlung über einen längeren Zeitraum, gute Kultivierbarkeit etc.) wurde die Zelllinie Hey zunächst stabil lentiviral transfiziert und mithilfe einer Neomycin-Resistenz über zwei Wochen selektiert. Im Western Blot konnte eine starke Bandenvergrößerung nachgewiesen werden (Abb. 3.5). Die Ergebnisse der Real-time PCR Analyse bestätigten die erfolgreiche Transfektion (ca. 230-fache Erhöhung der CapG-Expression in Hey S11-CapG-R-IN).

Behandlung von SK-OV-3 mit 15nM siRNA konnte im Western Blot nach fünf Tagen Inkubation eine vollständige Unterdrückung der CapG-Expression erwirken (Ermittlung der optimalen Einwirkzeit und Konzentration der siRNA erfolgte im Rahmen der Dissertation von N.Seier). Auch hier bestätigte die Real-time PCR die Ergebnisse und ergab eine Reduktion der CapG-Expression um etwa Faktor 5.

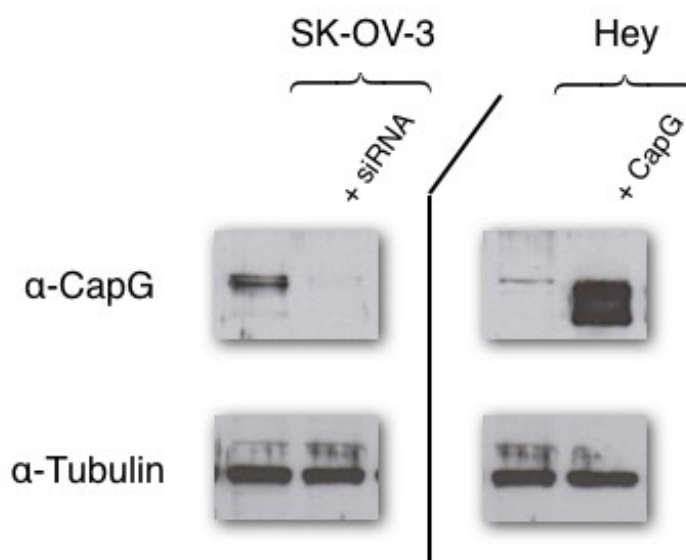


Abb. 3.5 Western Blot; 15nM siRNA führten nach fünf Tagen zu einem nahezu 100%-igen *knockdown* von CapG in SK-OV-3 Zellen; stabile CapG-Transfektion von Hey mit dem Vektor S11-CapG-R-IN führte zu einem deutlichen Anstieg der CapG-Expression; im Nachweis mit Tubulin-Erstantikörper konnte ein einheitlicher Proteingehalt von 20ng/ml nachgewiesen und somit das Ergebnis validiert werden.

Zelllinie	SK-OV-3	SK-OV-3 + siRNA
2- Δ ct	0,0512	0,0104

Zelllinie	Hey	Hey+ CapG
2- Δ ct	0,0083	1,9676

Tab. 3.2 Real-time PCR; Validierung der Western Blot Analyse, relative Ct-Werte bezogen auf *housekeeping*-Gen GAPDH

3.5. Einfluss der CapG-Expression auf das Invasions- und Migrationsverhalten

3.5.1. CapG beeinflusst das Migrationsverhalten

Als Aktin bindendes Protein nimmt CapG Einfluss auf die Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts und damit auf Zellbewegung und -verformung. Als solches ist es bereits 1986 in Makrophagen aufgefallen [Southwick and DiNubile 1986]. Motilität von Tumorzellen ist die Voraussetzung für Dissemination und Metastasierung, aber auch für die Invasivität. Das reine Migrationsverhalten, unabhängig von der Durchwanderung membranöser Barrieren, sollte zunächst im Scratch Assay ermittelt werden.

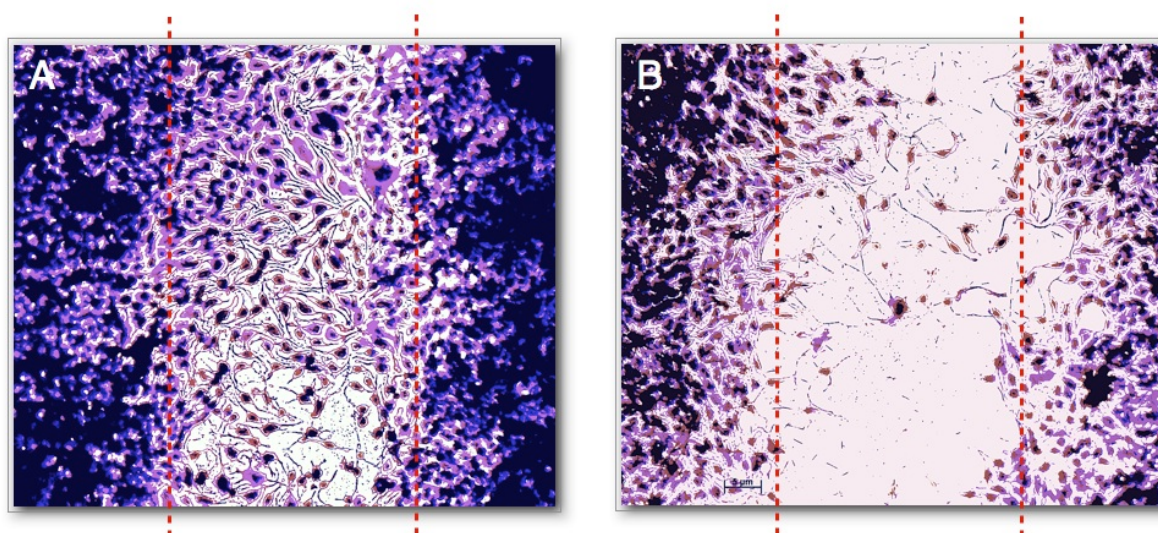


Abb. 3.6 Scratch Assay mit überexprimierenden Hey Zellen nach Transfektion (A) in der Gegenüberstellung mit der nativen Zelllinie Hey (B); drei Tage Kultivierung in Medium mit reduziertem Wachstumsfaktor nach *scratching*; die Transfektante zeigte eine schnellere Migration in den Spalt (rote Linie). $p < 0,0001$

Es zeigte sich eine schnellere Zellmigration nach CapG Überexpression in 14 von 19 gut vergleichbaren Kratzern (vier unabhängige Experimente mit je drei Kratzern pro Well und drei Wells insgesamt, Abb. 3.6). Auswertungsprobleme ergaben sich bei dieser Methode durch die ungleichmäßige Größe des Kratzers, der manuell ausgeführt wurde und mit Zuggeschwindigkeit und Winkel der aufgesetzten Pipettenspitze variierte.

Bei vollständigem Spaltverschluss der überexprimierenden Variante (100%) konnte ein durchschnittlicher Verschluss von 32% des Spaltes bei der nativen Zelllinie gezeigt werden ($p < 0,0001$).

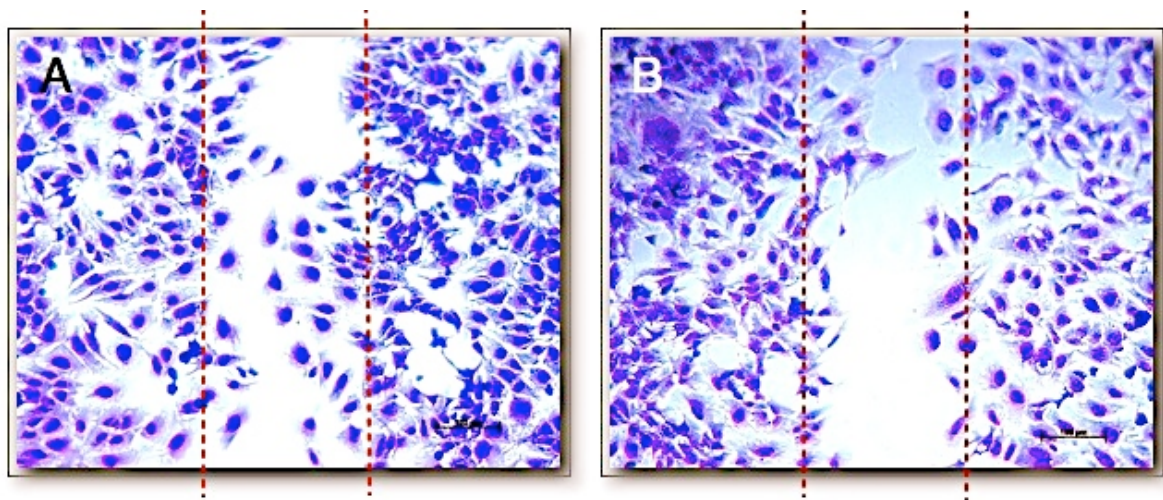


Abb. 3.7 Scratch Assay nach 24 Stunden Inkubation mit Wachstumsfaktor-reduziertem Medium; im Vergleich zeigt die native Zelllinie SK-OV-3 (A) eine stärkere Migrationstendenz als nach fünftägiger Behandlung mit 12,5 μM CapG-siRNA (B).

Die Parallelversuche mit der Zelllinie SK-OV-3, vor und nach fünftägiger Behandlung mit 12,5 μM CapG-siRNA, zeigten ebenfalls Unterschiede in der Migrationstendenz (Abb. 3.7). Die Tatsache jedoch, dass das Bewegungsverhalten der Zellen grundsätzlich deutlich ausgeprägter war als das der Hey Zellen (Abb. 3.6), erschwerte die Darstellung zum Zeitpunkt der größten Migrationsdiskrepanz unter den verschiedenen Zellpopulationen. Hier lag der Spaltverschluss nach 24-stündiger Beobachtungszeit im Durchschnitt bei 73% (SK-OV-3 nativ) verglichen mit 42% (SK-OV-3 nach siRNA-Transfektion), $p = 0,0004$ (Abb. 3.8).

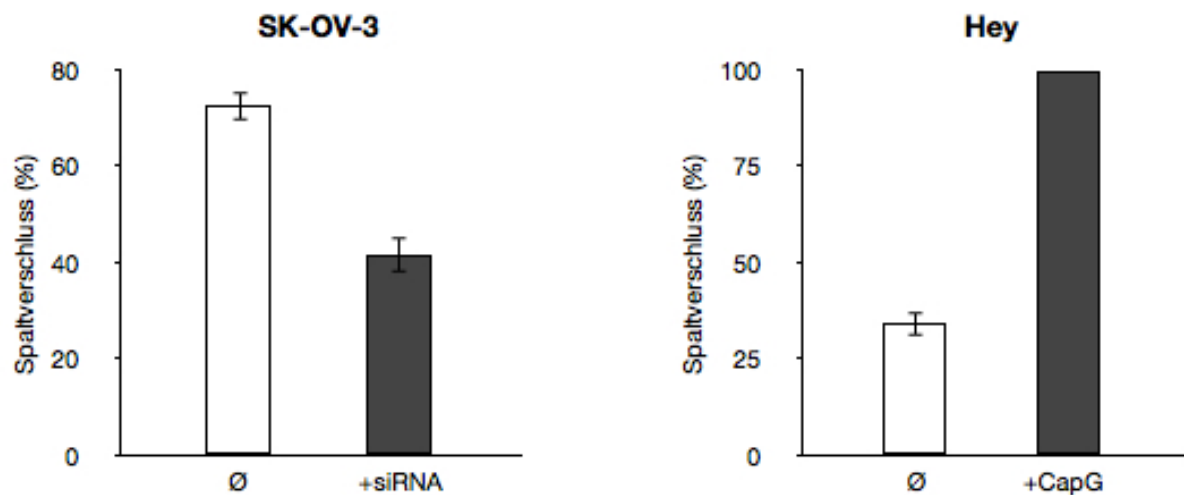


Abb. 3.8 Ergebnis des Scratch Assays. Deutliche Reduktion der Zellmobilität bei CapG *knockdown* in der Zelllinie SK-OV-3 (über 24 Stunden verglichen) und signifikante Zunahme der zellulären Ausbreitung bei CapG-Transfektion in der Linie Hey (3-tägige Inkubation). P-Werte 0,0004 respektive <0,0001

3.5.2. CapG-Expression korreliert mit Invasivität

Die Abhängigkeit der Invasivität von CapG konnte durch den *transwell invasion assay* Matrigel® sowie durch ein unabhängiges, zweites Verfahren (Trevigen, CultureCoat, Ergebnisse nicht dargestellt) nachgewiesen werden. Nach fünftägiger Behandlung von SK-OV-3 mit 12,5nM siRNA reduzierte sich die Invasivität um ca. 78%.

Die mikroskopischen Auswertungen des Invasionsassays ergaben visuell eine deutliche Reduktion der durchwandernden Zellen in der Gruppe der siRNA-behandelten Zelllinie SK-OV-3.

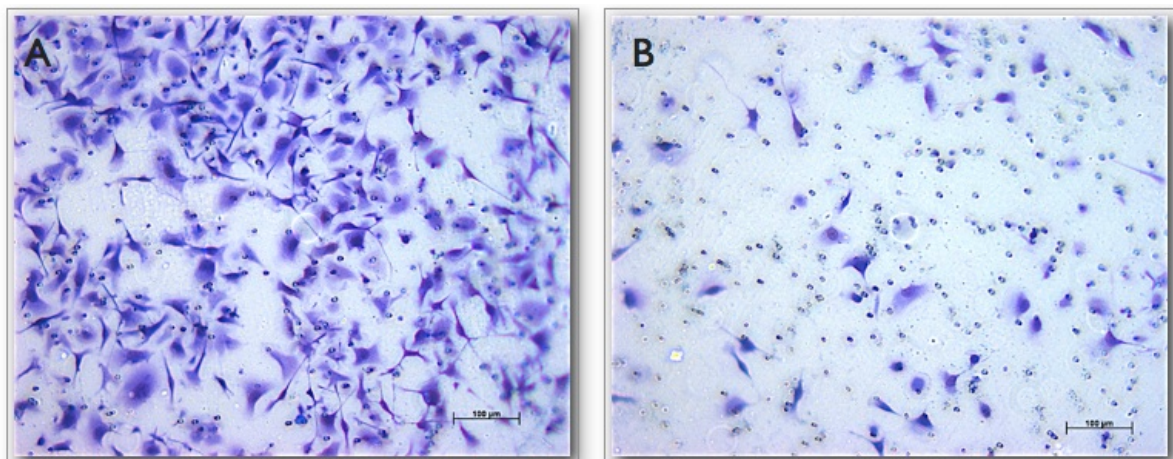


Abb. 3.9 Matrigel®Invasionsassay; SK-OV-3 nativ (links) zeigt eine deutlich stärkere Invasivität als nach Behandlung mit 12,5nM siRNA über fünf Tage (rechts).

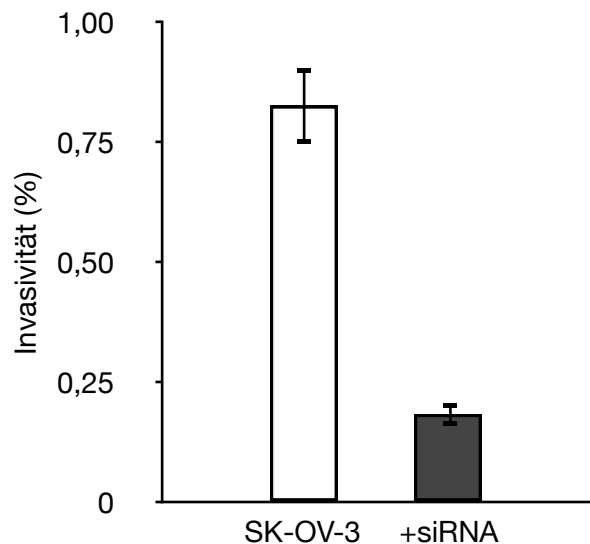


Abb. 3.10 Invasivitätsindex der Zelllinie SK-OV-3 vor und nach siRNA-Behandlung; bei 25.000 eingesäten Zellen invadieren knapp 0,83% die Membran vorher, während es nachher weniger als 0,18% sind ($p=0,0008$).

In absoluten Zahlen standen dabei im Durchschnitt 194 Zellen bei nativen SK-OV-3 (Abb. 3.9 A) nur 46 Zellen bei reduziertem CapG (Abb. 3.9 B) gegenüber. Dies entspricht einer Reduktion des Anteils invasiver Zellen auf 22,1% im Vergleich mit

dem Anteil bei unbehandelten SK-OV-3 Zellen (Abb. 3.10, $p=0,0008$). Der Versuch, in Hey-Transfektanten eine gesteigerte Invasivität im Invasionsassay nachzuweisen, gelang nicht. Trotz wiederholter Durchführung waren die Experimente aufgrund des vorzeitigen Zelltodes dieser Zellen nicht auswertbar.

3.6. Unterschiedliche subzelluläre Verteilung von CapG

Dass CapG ein zytoplasmatisches und nukleäres Protein ist, konnte bereits 1993 von Onoda et al. gezeigt werden. Diese Tatsache war in sofern ungewöhnlich, als dass weitere, strukturverwandte Proteine der Gelsolin-Familie, mit wenigen Ausnahmen, rein zytoplasmatische Proteine sind. Darüber hinaus beschäftigten sich u.a. DeCorte und Van Impe mit den funktionalen Konsequenzen einer nukleären Lokalisation von CapG für die Zelle. Eine Steigerung der Invasivität wurde dabei mehrfach in Verbindung mit Kern-CapG gebracht. Diese Erkenntnisse gaben Anstoß, die Rolle des Aktin bindenden Proteins im Kern auch bei Ovarialkarzinomzellen zu erforschen.

Die wiederholte Untersuchung der Zelllinien Hey und SK-OV-3 sowie der Transfektanten Hey S11-IN (Leervektor) und Hey S11-CapG-IN mittels Western Blot Analyse ergab eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation von CapG in diesen Proben.

Während SK-OV-3 Zellen, wie erwartet, eine Verteilung sowohl im nukleären als auch im zytoplasmatischen Kompartiment zeigten, verhielt sich dies mit der Ovarialkarzinomzelllinie Hey anders. Hier stellte sich eine ausschließliche Lokalisation im Kern dar, im Zytosol konnte wiederholt kein Protein nachgewiesen werden (Abb. 3.11).

Alle Proben wurden mit Histon3-Antikörper (für die Kernfraktion) und GAPDH-Antikörper (rein zytosolisch) auf Vorhandensein und Mengenäquivalenz des Proteingehalts (20µg/ml) getestet. Bandengleichheit bestätigte dies.

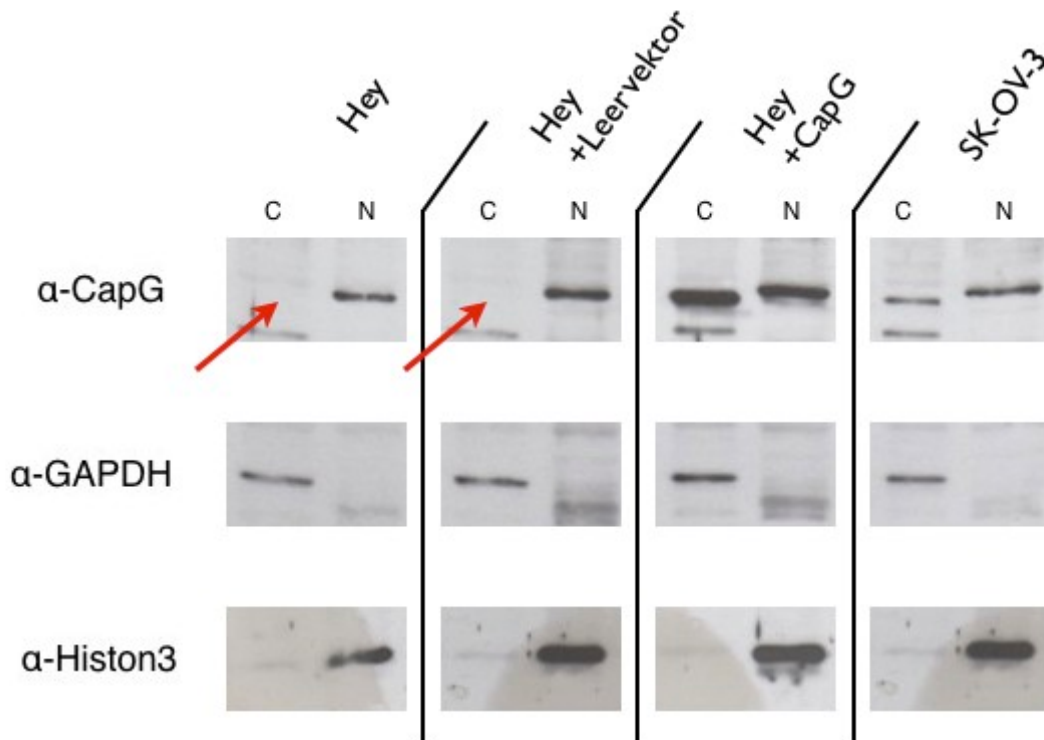


Abb. 3.11 Western Blot Analyse nach subzellulärer Fraktionierung der nativen Zelllinie Hey, der Transfektante mit Leervektor Hey S11-IN, der Transfektante mit CapG Überexpression Hey S11-CapG-R-IN sowie den kompartmentären Fraktionen von SK-OV-3. Diese zeigen eine unterschiedliche CapG Lokalisation. Deutlich erkennbar fehlt bei Hey nativ wie auch der entsprechenden Leervektor-Transfektante die CapG-Bande (38kD) in der zytosolischen Fraktion (s. roter Pfeil). Hingegen ist bei CapG-transfizierten Hey eine starke Bande auch im Zytosol sichtbar. SK-OV-3 zeigt eine bikompartimentelle Verteilung von CapG.

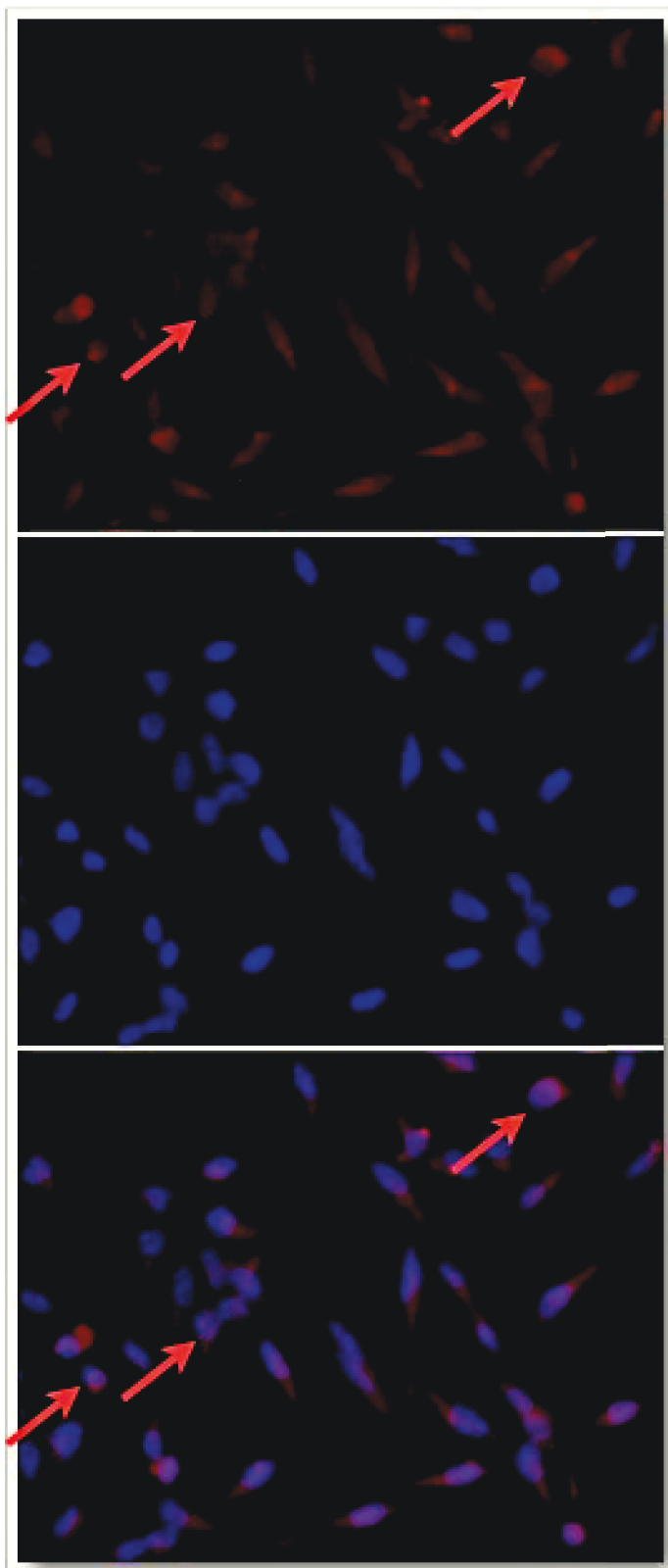
Die zwei Blots darunter zeigen die entsprechenden Banden der Kontrollantikörper für Histon3 (Kern) und GAPDH (Zytosol). Die Schwärze der Banden ist auf die Kopplung von Antikörper mit Meerrettich-Peroxidase zurückzuführen.

C - Zytoplasma, N - Nukleus

3.7. Validierung der nukleären Lokalisation bei Hey-Zellen

Um diese Ergebnisse der subzellulären Fraktionierung auf immunzytochemischer Ebene zu reproduzieren, wurden Antikörperbindungen mit Rhodamin-Zweitantikörper nachgewiesen.

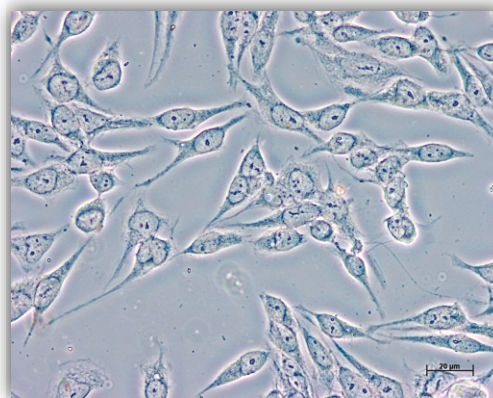
Eine zusätzliche Anfärbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), einem DNA-bindenden, blau fluoreszierenden Farbstoff, ermöglichte die Zuordnung der durch Rhodamin rot fluoreszierenden CapG-Bindungen zu einem zellulären Kompartiment. Zwar scheinen Hey-Zellen ihre CapG-Expression nicht vollständig auf den Kern zu beschränken. In den überwiegenden Fällen jedoch war eine bevorzugt nukleäre Lokalisation in den Zellen nachweisbar (Abb. 3.12). Dies mag das eindeutige Ergebnis der subzellulären Fraktionierung auf Proteinebene in Frage stellen, kann aber auch durch unspezifische Antikörperbindungen zustande kommen. Die auffällige Strukturnähe der gefärbten zytoplasmatischen Anteile lässt ebenfalls an kern-assoziierte Zellkompartimente denken. Dem gegenüber zeigt die Zelllinie nach Transfektion eine überproportional starke Zunahme des zytosolischen CapG Proteins (Abb. 3.13). Dieses Ergebnis ist konsistent mit den Resultaten der Immunoblot-Analyse (Kapitel 3.6.).

**Abb. 3.12**

Immunzytochemische Anfärbung von CapG in nativen Hey Zellen mit CapG-Ak (1:200 Verdünnung) und Rhodamin-Zweitantikörper (rot, oberste Darstellung), Kernfärbung mit DAPI (blau, mittig) sowie in der unteren Darstellung eine Projektion der beiden Fluoreszenz-Aufnahmen übereinander. Die roten Pfeile markieren auffällig kern-assoziierte Anfärbungen von CapG Protein in den Zellen.

Die untenstehende Aufnahme zeigt den Ausschnitt in Auflichtmikroskopie.

Vergrößerung 40x



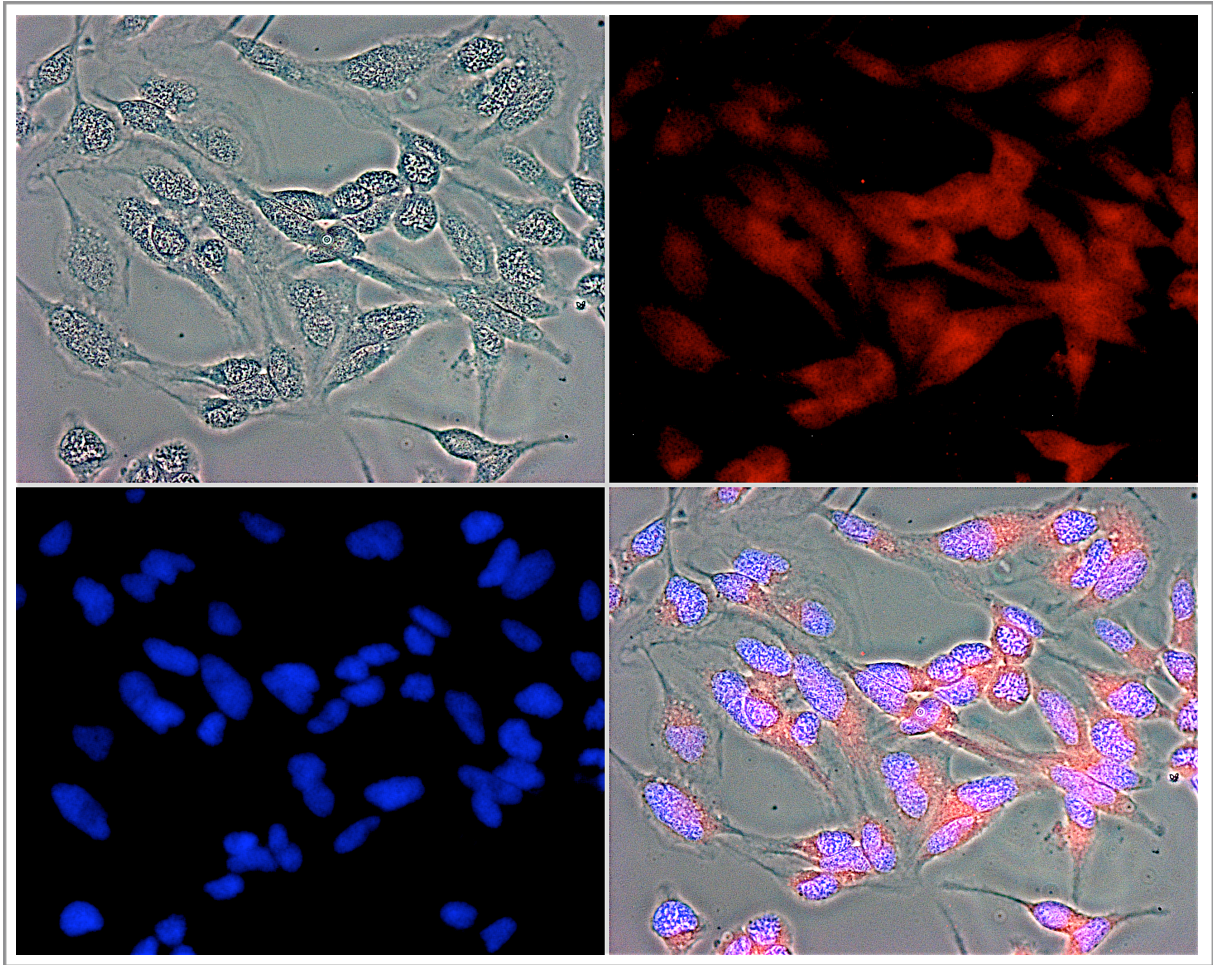


Abb. 3.13 Immunzytochemie Hey S11-CapG-R-IN; deutlich stärkere CapG-Färbung (rechts oben), v.a. auch zytosolisch. Die Abbildung links oben zeigt den Objekträgerausschnitt in der Auflicht-Mikroskopie. Rechts oben CapG-Färbung mit Rhodamin, links unten Kernfärbung DAPI. Die Bearbeitung rechts unten stellt eine Überlagerung aller drei Aufnahmen dar. Vergrößerung 64x

3.8. Isoelektrische Auftrennung der Varianten von CapG in der Zelllinie Hey

Die Ergebnisse der subzellulären Fraktionierung eröffneten die Frage nach neuer CapG Varianten in dieser Zelllinie, die als einzige der untersuchten Zelllinien (Mamma- und Ovarialkarzinom) eine deutlich präferenzielle Kernlokalisierung aufweist.

Schon lange ist es bekannt, dennoch in seiner Funktionalität bis heute nicht aufgeklärt, dass CapG teilweise phosphoryliert vorliegt und möglicherweise in diesem Zustand vor allem nukleär lokalisiert ist [Onoda and Yin 1993]. Unter Phosphatasebehandlung konnte eine Abnahme der sauren Fraktion in der zweidimensionalen Gelelektrophorese gezeigt werden, wohingegen Zugabe von Okadainsäure einen Wiederanstieg der phospho-

rylierten Varianten bewirkte. Dies bedeutet, dass ein Teil von CapG durch Okadainsäure-abhängige Phosphatasen dephosphoryliert wird.

Ob die Zelllinie Hey charakteristische posttranslationale Modifikationen aufweist, sollte durch zweidimensionale Gelelektrophorese ermittelt werden. Das durch Proteinextraktion mit RIPA-Lysispuffer und Phosphataseinhibitor gewonnene Proteinlysate wurde mit TCA und Aceton präzipitiert, wodurch einer vermehrten De-/Phosphorylierung entgegen-gewirkt wurde.

Nach isoelektrischer Fokussierung und anschließender Auftrennung des Gesamtproteins mittels SDS-PAGE wurden die Spots des CapG-Proteins durch Antikörper mit gekoppelter Meerrettich-Peroxidase sichtbar gemacht.

Zum Vergleich diente Gesamtzellprotein der Mamma-Ca Zelllinie MDA-MB-231 aus folgendem Grund. Per Sequenzierung war im Voraus ermittelt worden, dass beide Zelllinien an der Stelle 335 des CapG-Gens heterozygot in Bezug auf den dort vorliegenden *single nucleotide polymorphism* (SNP) rs6886 sind. Das bedeutet, dass ein Austausch der Basen an dieser Stelle zu einer unterschiedlichen Aminosäure-Codierung führt. Dies führt jeweils dazu, dass das CapG Protein beider Linien an dieser Stelle entweder die Aminosäure Arginin oder Histidin enthält. Massenspektrometrische Untersuchungen hatten ergeben, dass dieser Aminosäureunterschied mit einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes um 0,06 einhergeht und daher das charakteristische Doppelspotmuster der heterozygoten Zelllinien in der 2D-Gelelektrophorese erklärt. Darüber hinaus hatten Analysen der einzelnen Spots mittels MS/MS-Analyse ergeben, dass die Spots 2R/2H N-terminal acetylierte CapG-Varianten sind und die beiden Spots 1R/1H aus diesen vermutlich durch N-terminale Verkürzung hervorgegangen sind. Bei den Spots 3R/3H handelt es sich um phosphorylierte, daher saurere Varianten, deren Phosphorylierungsstelle allerdings bisher unbekannt ist. Hingegen konnte für den einzelnen Spot 4 R (Arg) festgestellt werden, dass es sich um eine an der Stelle 337 phosphorylierte Variante handeln muss. Denn die hier vorliegende Aminosäure Serin wird durch die Proteinkinase C nur bei vorhandenem Erkennungsmotiv phosphoryliert. Dieses Motiv fehlt bei der CapG-Variante mit Histidin an der Stelle 335, weshalb es keinen Spot 4H geben kann.

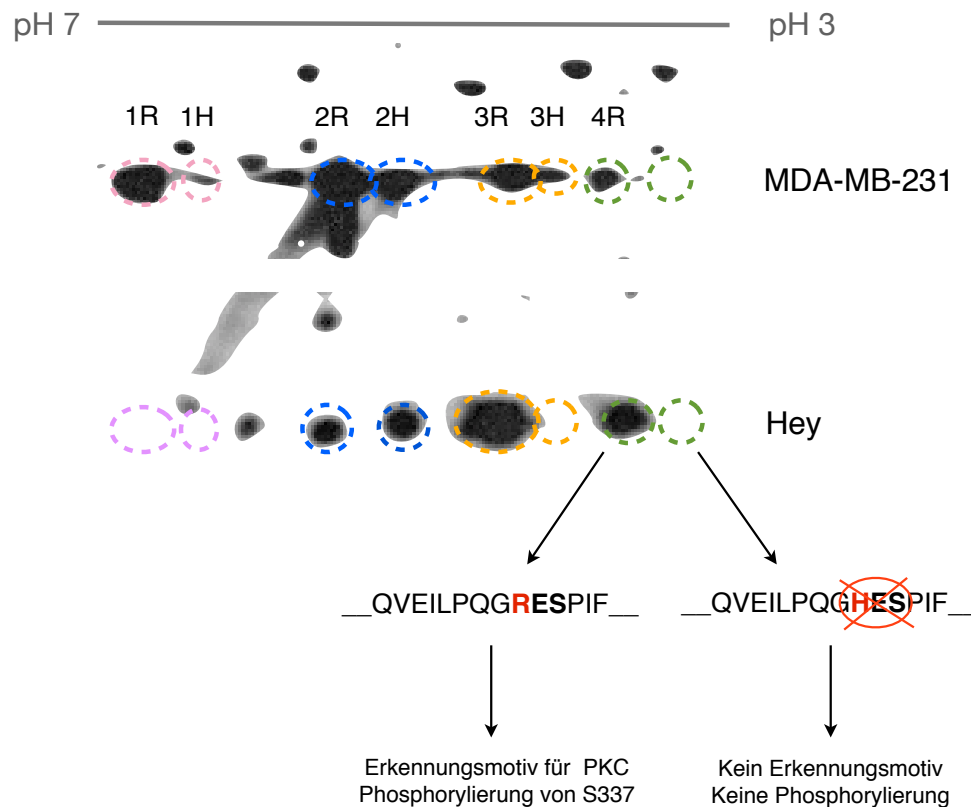


Abb. 3.14 2D-Gelelektrophorese von CapG-Gesamtprotein in Hey-Zellen im Vergleich mit heterozygoten Zelllinie MDA-MB-231. Bei der zweidimensionalen Auftrennung des Gesamtproteins im SDS-Gel zeigte die Zelllinie Hey keine Spots im alkalischen Bereich (1R/1H bei der Linie MDA-MB-231), einen schwächer ausgeprägten Doppelspot 2R/2H und jeweils nur als Arginin-Variante vorliegende Spots 3R und 4R. Das Fehlen von Spot 4H in beiden Zelllinien wird durch den Austausch der AS Arginin zu Histidin erklärt. Hierdurch entfällt das Erkennungsmotiv RES der Proteinkinase C und der Serinrest an der Stelle 337 wird nicht phosphoryliert.

Bei der Nebeneinanderstellung zeigte sich folgendes Bild (Abb. 3.14) in der Zelllinie Hey im Vergleich mit dem der Mamma-Ca Linie MDA-MB-231: Zunächst auffällig war die schwache Ausprägung der Hauptspots 2R und 2H, welche in MDA-MB-231 den größten Anteil am Gesamtprotein einnehmen. Dass allerdings beide Spots grundsätzlich erkennbar waren, bestätigte die Sequenzierungsergebnisse, wonach beide Zelllinien heterozygot für den SNP rs6886 sind.

Der nächst saurere Spot (3R) war dem gegenüber sehr stark darstellbar. CapG liegt hier in phosphorylierter Form vor, wie massenspektrometrische Analysen von CapG in Mamma-Ca Zelllinien ergeben hatten [Seier 2009]. Der korrespondierende Doppelspot 3H konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenfalls phosphoryliert und sehr prominent in

Hey zeigte sich der Spot 4R. Wie erwartet fehlte auch hier der Spot 4H (s.o.). Insgesamt wurde ein auffallend hoher Anteil phosphorylierter CapG-Varianten nachgewiesen. Hingegen ließ das Fehlen der Spots 1R und 1H auf einen Mangel an N-terminal verkürzten CapG-Proteins schließen.

3.9. Die Verteilung der Allele im SNP rs6886 bei Ovarial- und Tubenkarzinom

Als relativ neuartige Methode zur Klassifizierung von Gen-Fragmenten bot sich das HRM-Verfahren zur Analyse des bekannten SNP rs6886 an. Hierbei wird die DNA zunächst in einer Real-time PCR vervielfältigt, wobei durch spezielle Primer eine besonders kurze Oligonukleotidsequenz erzeugt wird. Hierin liegt der Polymorphismus, dessen Schmelzverhalten je nach Allelfrequenz auf Homo- oder Heterozygotie hinweist. Die Erkenntnisse über eine Serin-Phosphorylierungsstelle zwei Basenpaare *downstream* von dem Polymorphismus an der Stelle 335 (Exon 10, CapG) lassen eine funktionelle Relevanz dieses SNP mutmaßen. Wie die Doppelspots nach zweidimensionaler gelelektrophoretischer Auftrennung zeigen, führt ein Austausch von Adenosin zu Guanin an der Stelle 1254 der Basenpaare zu einer veränderten Aminosäuresequenz. Histidin (H) wird dabei zu Arginin (R), einer basischeren Aminosäure. Dies erklärt die Verschiebung der Spots in der 2D-Gelelektrophorese in basischere pH-Bereiche. Abb. 3.15 zeigt die optimale Auftrennung dreier Referenzzelllinien. Diese wurde für die weitere Analyse als Standard festgelegt.

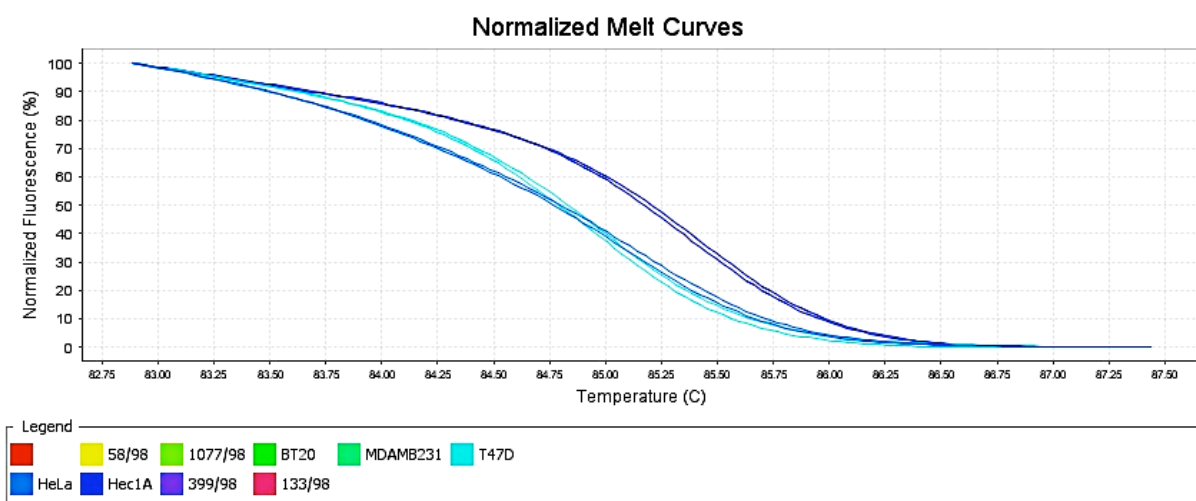


Abb. 3.15 Etablierung des SNP rs6886 für die SNP-Analyse; Allele verschiedener Zelllinien zur Ermittlung von 3 Referenz-Zelllinien; homozygot Hec1a (G/G) und T47D (A/A), heterozygot HeLa.

Die Blut-DNA eines 262 Proben umfassenden Ovarial-Ca Kollektivs wurde für die Untersuchung des SNP verwendet. Dafür wurde Patientinnen mit Ovarial-Ca zwischen 1997 und 2006 in der Universitätsfrauenklinik Blut abgenommen und dem Labor zur Verfügung gestellt. Ein Normalkollektiv mit Proben weiblicher Gesunder, deren Alter in etwa mit den Fällen übereinstimmt, enthielt 107 Proben. Des Weiteren konnte Blut-DNA von 12 Tubenkarzinom-Patientinnen isoliert werden. Ein Abgleich mit HapMap (International HapMap Project; öffentliche Datenbank für bekannte genetische Varianzen im humanen Genom; www.hapmap.org) lieferte folgende Genotyp-Frequenzen für den SNP rs6886 in der europäischen Bevölkerung: G/G (=homozygot Arg) 43,3%, G/A (=heterozygot Arg/His) 48,3% und A/A (=homozygot His) 8,3%.

Diese Werte konnten bei der Analyse des Normalkollektivs mit geringer Abweichung reproduziert und die Güte der Proben bzw. die Reliabilität der Methode somit verifiziert werden. Homozygot G/G (Arg) lag bei 42%, heterozygot G/A (Arg/His) bei 48% der Proben, homozygot für die His-Variante (A/A) waren 10%.

Eine Abweichung von dieser Verteilung konnte in beiden Fall-Kollektiven, sowohl Ovarial-Ca als auch Tuben-Ca, gezeigt werden (Abb. 3.16, Tab. 3.3). Als Vergleichsgröße wurde in den Auswertungen das vorliegende Normalkollektiv gewählt, da es sich hierbei um eine Auswahl weiblicher Patientinnen vergleichbaren Alters handelt. Es ist demnach geeigneter als ein randomisiertes HapMap-Kollektiv.

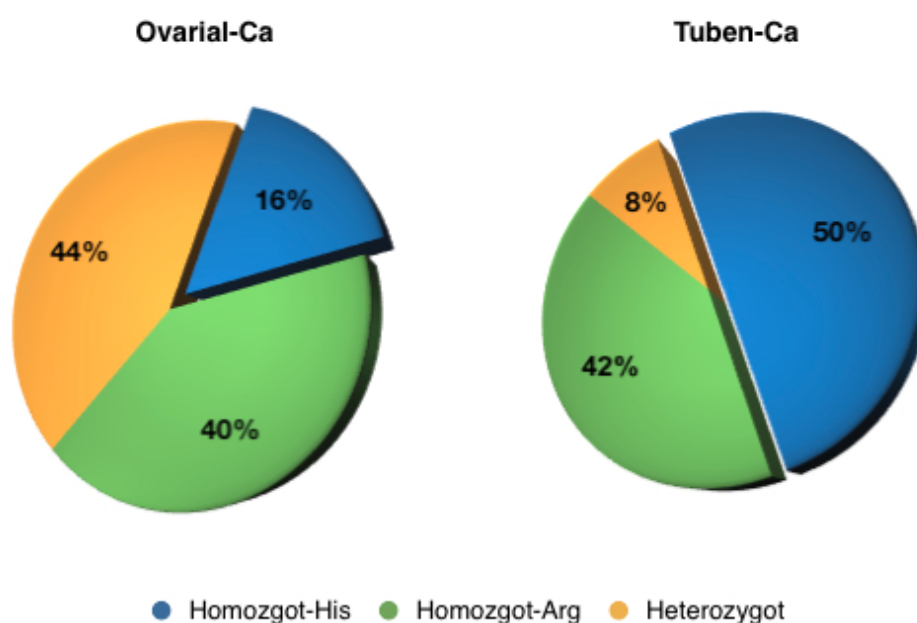


Abb. 3.16 Diagramme der Genotyp-Verteilung beim Ovarial- und Tuben-Ca bezogen auf den SNP rs6886; deutliche Unterschiede liegen vor allem bei der Ausprägung der homozygoten His-Varante (blau) vor. Diese liegt beim Tuben-Ca mit 50% weit überdurchschnittlich (Durchschnitt der Kontrollen 10%) vor.

Beim Ovarial-Ca (n=262) zeigten 40% den homozygoten Genotyp für die Arginin-Variante, 44% waren heterozygot und 16% waren an der Stelle 335 homozygot für die His-Variante. Dies entspricht einer Steigerung von 6% gegenüber dem Normalkollektiv und sogar 8% bezogen auf HapMap.

Bei Tuba-Ca Proben (Abb. 3.16) war diese Abweichung besonders ausgeprägt. Die Genotyp-Frequenzen waren folgendermaßen verteilt: G/G (Arg) 42%, heterozygot Arg/His nur 8% und die Frequenz der homozygoten His-Variante (A/A) lag hier bei 50%. Ein Anstieg dieser scheint demnach mit einer Reduktion des heterozygoten Genotyps einherzugehen.

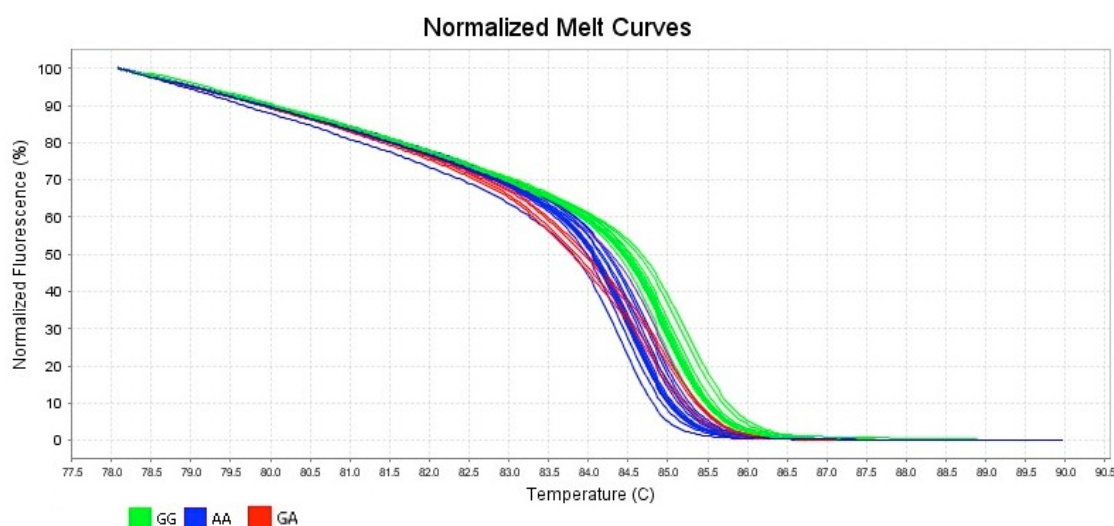


Abb. 3.17 HRM-Schmelzkurven von 12 DNA-Tumorproben aus der Tuba uterina; die Kurven zeigen das unterschiedliche Schmelzverhalten der DNA-Stränge bei 90°C in Abhängigkeit von den vorliegenden Allelen in der amplifizierten Sequenz; als Referenz für AA-homologe Proben diente DNA der Zelllinie T47D, für heterozygote BT-20 und GG-homologe Proben He-La.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm SPSS (Version 18, IBM®). Der Vergleich von Ovarial-Ca und Normalgewebe hinsichtlich der Frequenz von Homozygot-Histidin stellte sich im zweiseitigen χ^2 -Test als nicht signifikant dar ($p=0,153$). Auch im Vergleich der Allelfrequenzen von Adenosin und Guanin konnte keine deutliche Signifikanz ($p=0,069$) nachgewiesen werden.

Die Abweichung der Genotyp-Häufigkeiten unter den Eileiterproben jedoch war mit $p<0,0001$ deutlich signifikant. Auch in der Allelfrequenz konnte diese Signifikanz mit $p=0,025$ gezeigt werden.

Genotyp	Kontrollen	Ovarial-Ca	Tuben-Ca	HapMap
Heterozygot (G/A)	42 % (45)	44 % (115)	8 % (1)	48 %
Homozygot Arg (G/G)	48 % (51)	40 % (105)	42 % (5)	43 %
Homozygot His (A/A)	10 % (11)	16 % (42)	50 % (6)	8 %

Tab. 3.3 Genotyp-Frequenzen für den SNP rs6886 (Exon 10 im CapG-Gen) in Prozent und Absolutwert

3.10. Expressionsverteilung von sechs potenziellen CapG-Zielgenen

Für die Evaluation von potenziellen CapG-Zielgenen, die bei der Microarray-Analyse (Kap. 1.4.) an Mammakarzinom-Zelllinien eine CapG-abhängige Regulation zeigten, sollten die im Zuge der Microarray Analyse ermittelten Expressionsdaten zunächst durch Real-time PCR bestätigt werden.

Für die Validierung wurden dafür Primer hinsichtlich optimaler Real-time PCR Bedingungen etabliert. Exemplarisch dient hier die Verdünnungsreihe der Zelllinie MDAH mit den Primern für das Primerprodukt IGF2 (Abb. 3.18). Die Menge an PCR-Produkt nimmt mit steigender Verdünnung der cDNA dieser Zelllinie erwartungsgemäß ab.

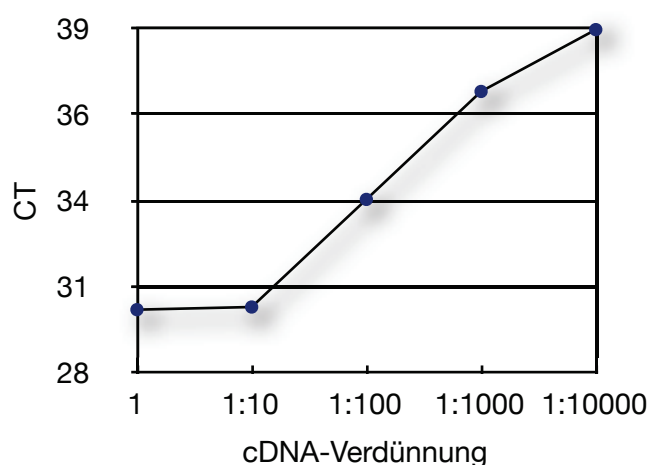


Abb. 3.18 Verdünnungsreihe der cDNA der Zelllinie MDAH zur Etablierung der IGF2-Primer (Quantitect Primer Kit, Qiagen); je stärker der Primer verdünnt wird, desto weniger PCR-Produkt (IGF2 mRNA) liegt vor (steigende Ct-Werte).

Die Ergebnisse der Real-time PCR konnten die Microarray-Resultate im Trend bestätigen (Tab. 3.4). Die Expressionen der sechs Kandidatengene variierten entsprechend der veränderten CapG-Expression grundsätzlich wie durch die Chip-Analyse ermittelt, die Stärke dieser Verschiebung war jedoch etwas geringfügiger.

	MDA-MB-231 (siRNA vs. unbehandelt)	PCR	Regulation	BT-20 (Überexpression vs. Kontrolle)	PCR	Regulation
CapG	27,67		down	1,55		*
Ankyrin 3	3,70	5,65	down	1,65	1,42	up
Betacellulin	7,50	4,83	down	2,06	1,92	up
IGF2	10,34	16,13	up	1,92	1,32	down
RASGRF1	5,59	2,76	down	1,67	1,34	up
STAT4	2,71	1,53	down	1,51	2,38	up
Thymosin β 15b	2,97	2,72	down	1,67	1,13	up

Tab. 3.4 Ergebnisse der Microchip-Analyse und deren Validierung mittels quantitativer Real-time PCR: Auswahl von sechs Genen, wobei jeweils die relative Expressionsänderung bezogen auf die native Zelllinie ermittelt wurde. Die vorliegenden Werte stellen demnach den Faktor dar, um welchen die Expression sich verändert hat.

(*) Dass sich in CapG-überexprimierenden BT-20-Zellen eine down-Regulation zeigte in der Microarray-Analyse lag daran, dass das Oligonukleotid des CHIPs einen Abschnitt ausserhalb des kodierenden Gen-Bereiches von CapG abdeckte, der eingebrachte S11-CapG-IN-Vektor jedoch nur die kodierende Sequenz enthielt. Demnach wurde nur endogenes CapG nachgewiesen.

Mit dem Ziel, diese sechs potenziellen CapG-Targetgene zunächst in unterschiedlichen Zelllinien zu charakterisieren, wurde deren Expression in zwölf Zelllinien (sechs Mamma-Ca, vier Ovarial-Ca, zwei Endometrium-Ca und eine Zervix-Ca) durch Real-time PCR ermittelt. Dabei galt ein besonderes Augenmerk der Fragestellung, ob eine Beziehung dieser Gene hinsichtlich ihrer Expression mit CapG erkennbar ist.

Anstelle der Modifikation des zellulären CapG-Anteils einer Zelllinie, wie oben beschrieben durch siRNA-vermittelte Reduktion oder stabile Transfektion (Tab 3.4), wurden die Zelllinien entsprechend ihrer unterschiedlichen nativen CapG-Expression gegeneinander aufgetragen.

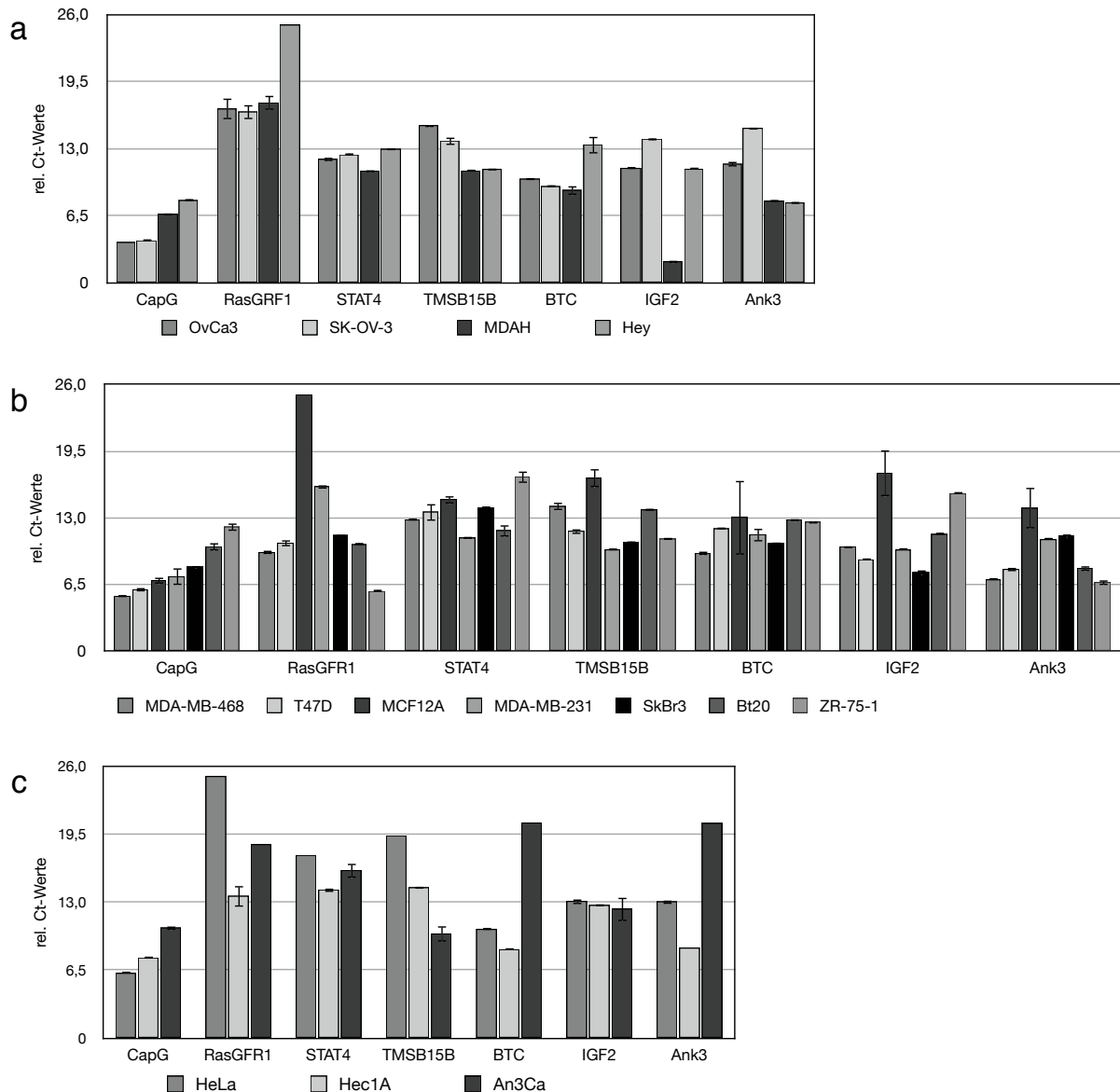


Abb. 3.19 Real-time PCR: Expressionsdaten der sechs Target-Gene in Abhängigkeit von CapG (aufsteigende Ct-Werte aufgetragen, d.h. abnehmendes PCR-Produkt); alle Ct-Werte wurden auf das *housekeeping*-Gen GAPDH bezogen und sind deshalb relative Ct-Werte. Zelllinien: **a.** Ovarial-Ca **b.** Mamma-Ca **c.** Zervix-Ca und Endmetrium-Ca. Die Werte zeigen keine eindeutige Korrelation der Genexpressionen mit CapG.

Nach Auftragen der relativen Ct-Werte (entsprechend absteigender Expression des Gens) zeigt sich zunächst keine eindeutig CapG-korrelierte Verteilung der sechs Gene sowohl innerhalb der Tumor-Subgruppen (Abb. 3.19 a-c) als auch unter den Gruppen. Im Zuge der Charakterisierung der Mamma-Ca Zelllinien schien es auffällig, dass sich die Expressionswerte von CapG und den sechs weiteren Genen hinsichtlich ihres Expressionsniveaus ähnelten, wohingegen in den beiden anderen Tumorguppen CapG eine stärkere Expression als diese sechs Gene zu haben scheint.

Was Hinweise auf einen potenziellen Zusammenhang der Gene mit dem CapG-Gen betrifft, so wiesen STAT4 und BTC unter den Zelllinien ein vergleichbares Expressionsmuster auf wie CapG. Die Gene RasGFR1, Thymosin β 15b und Ank3 lieferten dafür hier zunächst keinen Anhalt.

Bei der Auswertung der Ovarial-Ca Zelllinien OvCa3, SK-OV-3, MDAH und Hey zeigte sich, wie oben erwähnt, dass CapG unter allen Genen am stärksten exprimiert wird. Einen Bezug untereinander konnte bei Thymosin β 15b und Ankyrin 3 vermutet werden. Beide Genexpressionen verhielten sich bei den Zelllinien gegensinnig zu CapG. RasGRF1 und STAT4 zeigten in der Tendenz gleichsinnig variierende Ct-Werte.

Insgesamt gesehen konnte hier aber höchstens von Tendenzen gesprochen werden.

In der Analyse der beiden Zelllinien Hey und SK-OV-3 alleine (großer Unterschied in der CapG-Expression) hingegen waren die Unterschiede stärker und auf die Chip-Daten bezogen in vier Fällen (RasGRF1, STAT4, BTC, IGF2) vergleichbar. Die Expressionsprofile von Ank3 und Thymosin β 15b verliefen jedoch entgegen der CapG-Expression.

3.11. IGF2 und Ank3 sind invers zu CapG reguliert

Um einen direkten Vergleich mit den Microarray-Resultaten sowie den uneinheitlichen Ergebnissen des Zelllinien-Screenings zu schaffen, wurde RNA aus siRNA-behandelten Zellen sowie auch aus Hey-Transfektante und den nativen Zelllinien isoliert und in Form von cDNA einer Expressionsanalyse mit Real-time PCR unterzogen. Die Expressionsveränderungen (jeweils normiert auf das *housekeeping*-Gen GAPDH) zeigen vorwiegend geringe Expressionsunterschiede.

Aus den Graphen wird ersichtlich, dass die Regulation der sechs ausgewählten Gene in ihrer Komplexität durch den vorliegenden Versuchsaufbau nicht hinreichend verstanden werden kann. Die Reduktion der CapG-Expression durch siRNA sowie die erfolgreiche Expressionssteigerung in CapG Transfektanten (um 236-fach) zeigen, dass das Grundkonstrukt des Versuches etabliert werden konnte (Abb. 3.20). Hingegen zeigen die Genexpressionen der potenziellen Targetgene keine einheitliche CapG-Korrelation. Zunächst wird deutlich, dass siRNA-Knockdown stärker modulierende Effekte auf die mRNA-Expression der untersuchten Gene hat als dies bei Hochregulation, d.h. nach Transfektion der Fall ist.

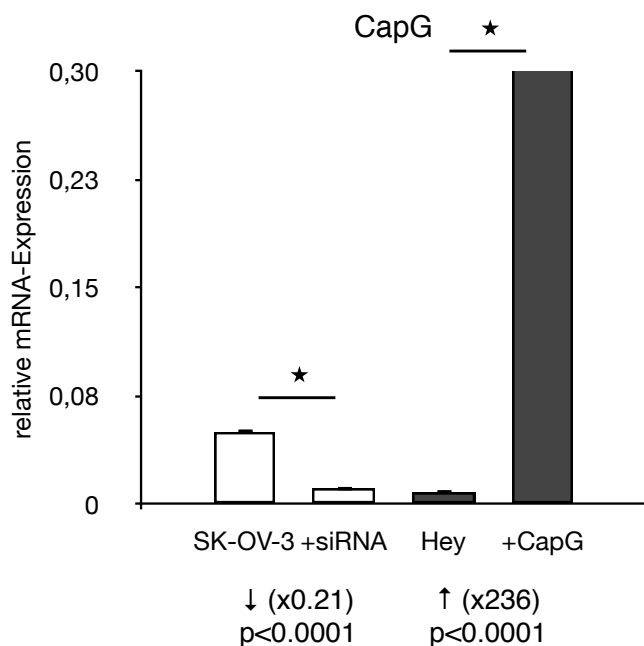
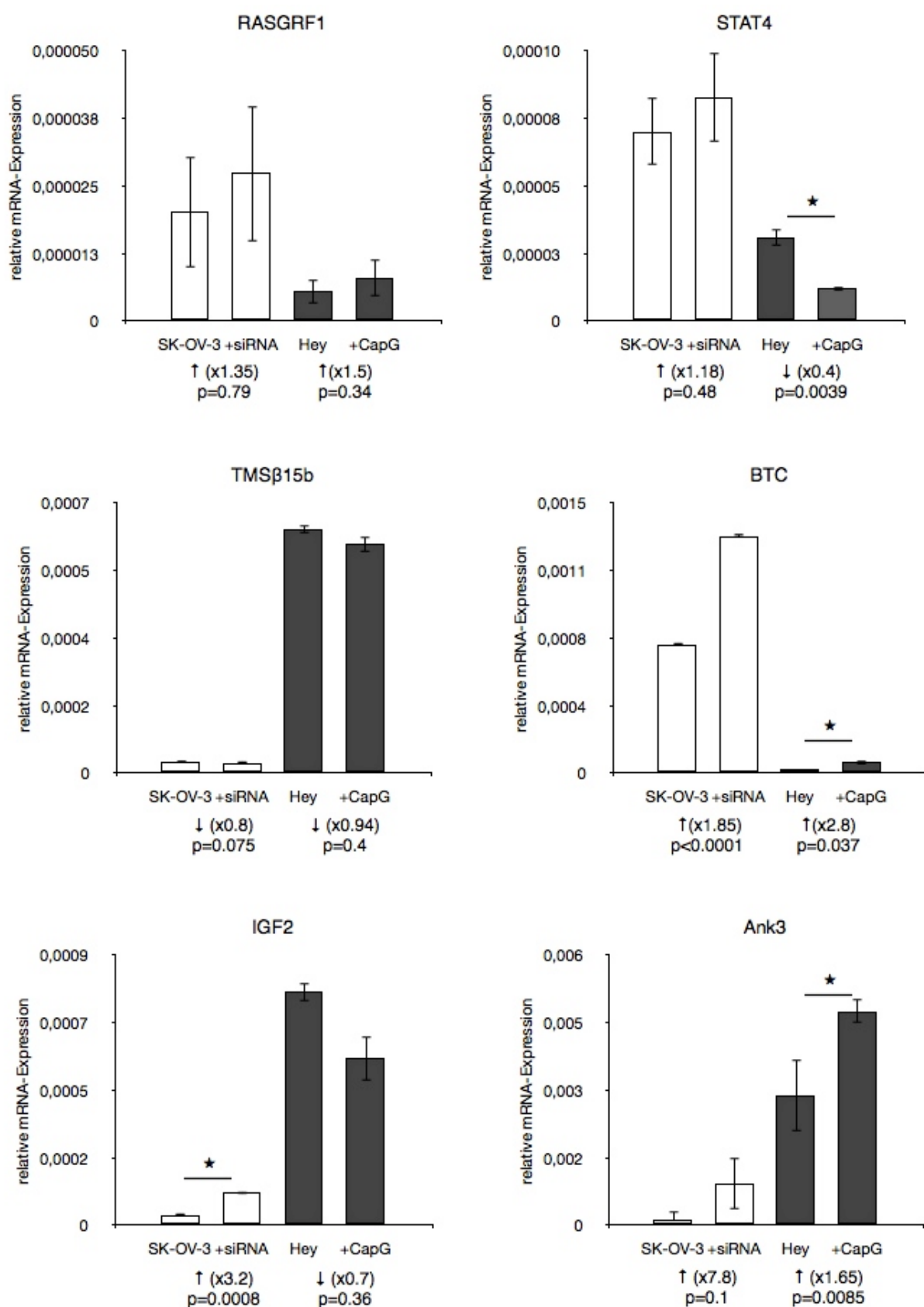


Abb. 3.20 Real-time PCR:
Gegenüberstellung von SK-OV-3
nativ und nach siRNA-Behandlung
sowie Hey vor und nach Trans-
fektion mit dem CapG-Plasmid

Die Expressionsunterschiede sind vorwiegend gering und bis auf IGF2 und STAT4 weisen die Expressionsprofile nicht auf eine differentielle Expression in beide Richtungen, d.h. sowohl unter CapG-Reduktion als auch bei Überexpression des CapG-Gens hin. Der geklammerte Wert (x) gibt den $\Delta\Delta Ct$ -Wert, d.h. den relativen Expressionsunterschied unter den Gruppen an, wobei die Pfeile signalisieren, ob es sich um einen Expressionsanstieg oder eine -reduktion handelt.



Die rel. Ct-Werte von RasGRF1, STAT4 und Thymosin β 15b sind in ihrer Divergenz so gering, dass man eine ≤ 2 -fache Veränderung in beide Richtungen in dieser Auswertung vernachlässigt hat.

Im Falle von IGF2 bestätigt sich die Tendenz der Chip-Analyse, die Regulation scheint ebenfalls invers zu CapG zu sein: 3,2-fach hoch bei 5-facher CapG-Reduktion, hingegen nur 1,4-fach erniedrigt bei starker Überexpression von CapG in Hey.

Ankyrin 3 zeigte eine 7,8-fach stärkere Expression in CapG-reprimierten Zellen. Auch wenn dies unter Transfektion nicht ebenfalls darzustellen war, so konnte doch ein putativer Einfluss von Ank3 zumindest in Ovarialkarzinomzellen im Allgemeinen durch dieses Ergebnis angenommen werden. Auf eingehendere Analysen der drei erstgenannten Gene wurde aufgrund der mangelnden Anhaltspunkte im Folgenden verzichtet.

	<i>fold change</i>						
	CapG	RASGRF1	STAT4	TMSβ15b	BTC	IGF2	ANK 3
SK-OV-3/ SK-OV-3 +siRNA	↓ 0.21	↑ 1.35	↑ 1.18	↓ 0.83	↑ 1.85	↑ 3.2	↑ 7.8
Hey/ Hey +CapG	↑ 236	↑ 1.5	↓ 0.4	↓ 0.94	↑ 2.8	↓ 0.7	↑ 1.65

Tab 3.5 Zusammenfassung der Expressionsänderung

3.12. Ank3 und IGF2 zeigen keine Korrelation zu CapG in Tumorproben

Da Zelllinien in ihrer Stichprobengröße und Repräsentativität unzureichend für verallgemeinernde Aussagen zum Ovarialkarzinom sind, wurden 30 Gewebeproben (T) von Ovarialtumoren ausgewählt, um die Expressionsprofile von CapG, Ank3 und IGF2 zu ermitteln.

Dem gegenüber sind 15 Proben aus ovariälem Normalgewebe (N) gestellt worden. Die Auswahl der einzelnen Proben erfolgte nach dem Kriterium der Verfügbarkeit und war mangels Probenmenge beschränkt auf die Vorliegenden.

In der statistischen Analyse zeigten sich weder die mRNA Expressionsdaten des IGF2 Gens noch die des Ank3 Gens mit der CapG-Expression direkt korrelierend. Dabei wurden Subgruppen gebildet, wobei zunächst alle Expressionsdaten als relative Expression zur durchschnittlichen Expression in einem Normalkollektiv berechnet wurden. Als Überexpression galt schließlich ein *fold change*, der oberhalb der

Standardabweichung vom Mittelwert des Normalkollektivs liegt. Dies entsprach einer $\geq 2,1$ -fach höheren CapG-Expression, einem Cutoff von $\geq 1,9$ -fach für Ank3 und $\geq 2,9$ -fach für IGF2 bezogen auf den Durchschnitt der Expression beim Normalkollektiv. Entsprechend wurde eine Expression unterhalb der Standardabweichung als niedrige Expression eingestuft.

Expression /fold change	IGF2 ↑	IGF2 ↓	Ank3 ↑	Ank3 ↓
CapG ↑	2	5	0	7
CapG ↓	0	0	0	1

Tab. 3.6 Vierfeldertafel der mRNA Expressionsdaten; Fallzahlen sind Subgruppen zugeordnet

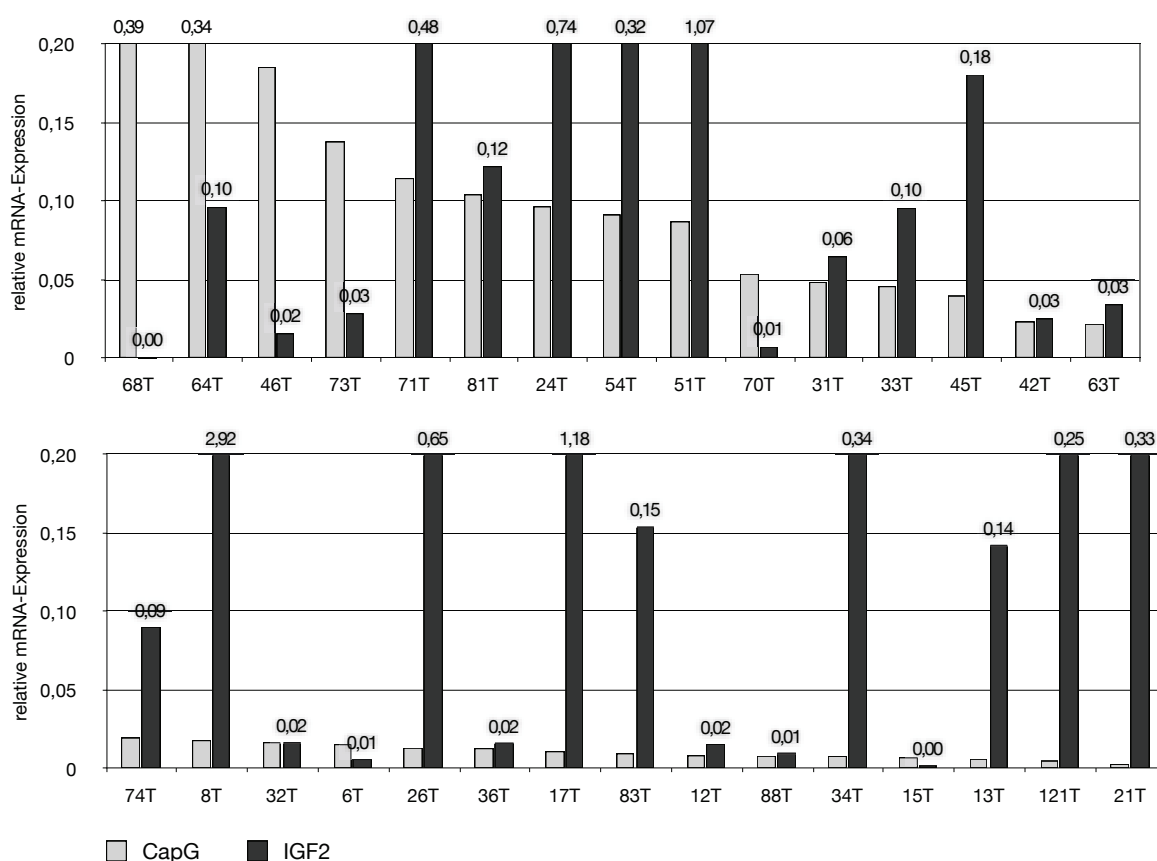


Abb. 3.21 a Real-time PCR Daten von CapG und IGF2, normiert und in Relation zum *housekeeping*-Gen GAPDH: 30 Tumor-Gewebeproben aus Ovarialkarzinomgewebe

Die Werte sind nach absteigenden CapG-Expressionen sortiert (hellgraue Balken). Verglichen wurden IGF2 und CapG-Expressionen. Es ist aus diesen Graphen keine direkte Korrelation ersichtlich.

Auffällig waren die stark unterschiedlichen Expressionen von IGF2 unter den Proben (Abb. 3.21 a). Eine anschließende Analyse von IGF2 und klinischen Daten der Proben ergab folgende Beobachtung: in 10 von 30 Fällen existieren klinische Daten zur TNM-Klassifikation des Tumors. Darunter zeigten diejenigen mit Grading G=3 und/oder T $\geq$ 2c (6 Fälle) alle eine weit überdurchschnittlich hohe IGF2-Expression.

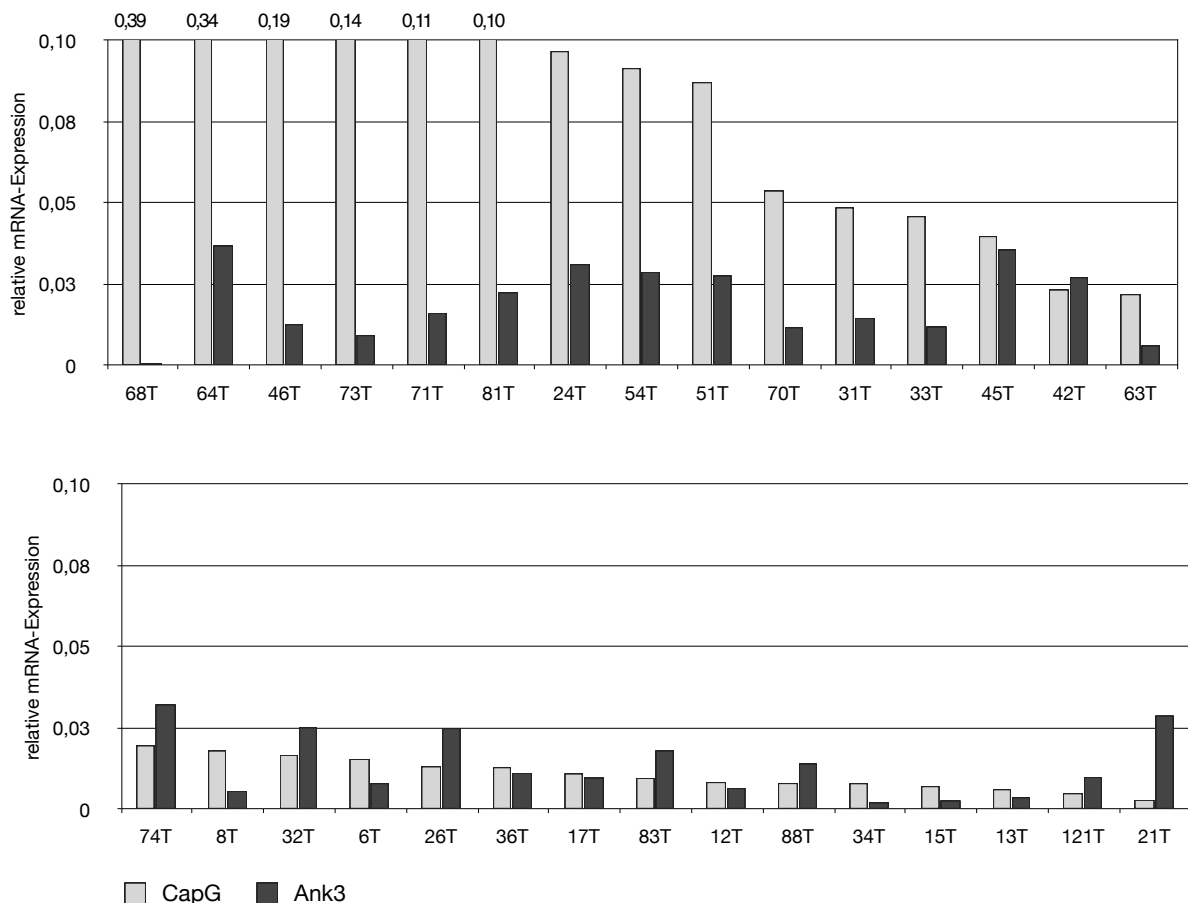


Abb. 3.21 b Real-time PCR Daten von CapG im Vergleich mit Ank3, normiert und in Relation zum *housekeeping*-Gen GAPDH

Proben siehe Abb. 3.24 a

Auch hier keine direkte Korrelation dieser zwei Expressionsprofile miteinander.

Der Vergleich von Normalgewebe (n=15) mit Tumorgewebe (n=30) ergab eine durchschnittlich 2-fache Steigerung der CapG-mRNA-Expression in den Tumoren bezogen auf die mittlere Expression in Normalgewebeproben. Dies bestätigte die Vorergebnisse, die bereits eine Überexpression in Ovarialkarzinomen postuliert hatten [Dahl et al. 2005].

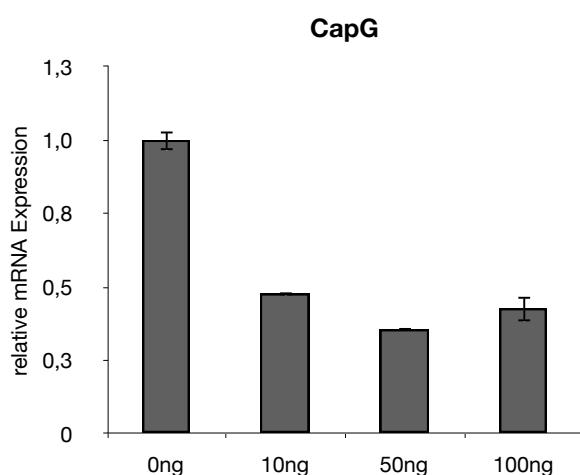
3.13. Expressionsprofile unter IGF2-Stimulation

In diversen Tumoren, unter anderem beim Mammakarzinom benigner und maligner Dignität, wurde bereits ein Einfluss von IGF2 auf die Progression von Tumorwachstum und -differenzierung postuliert [Yee 1994]. Obwohl die durchschnittliche Expression von IGF2 bei ovarialen Tumorproben herabgesetzt zu sein scheint (im Durchschnitt auf die Hälfte), ist ein Zusammenhang von IGF2 und fortgeschrittenen Tumorstadien auch beim Ovarialkarzinom nicht auszuschließen. Denn auch bei Brustkrebs scheint es eine Korrelation mit der Prognose der Erkrankung zu geben [Yee et al. 1994].

Die vorliegende Untersuchung diente vornehmlich dazu, Anhaltspunkte für einen möglichen Feedback Mechanismus zwischen IGF2 und CapG zu erhalten und darüber hinaus auszuschließen, dass die IGF2 Expression anstelle von CapG einen direkt modulierenden oder regulierenden Einfluss auf die Expression der fünf Kandidatengene hat.

Eine Expressionanalyse von SK-OV-3 (endogen hoch CapG exprimierend, jedoch niedrige IGF2-Expression) nach 26-stündiger Stimulation mit unterschiedlich hohen IGF2-Konzentrationen zeigte einen moderaten Einfluss auf die Expression der sechs übrigen Gene (Abb. 3.22). Eine zweistündige Hungerperiode vor Zugabe des Wachstumsfaktors sollte sicherstellen, dass alle Ligandenbindestellen für das Stimulans zur Verfügung stehen.

Die Auswertung der Daten ergibt, dass ein moderater Abfall der CapG-Expression unter IGF2-Stimulation stattfindet. Dies passt zu der Erkenntnis, dass auch CapG-Hochregulation zu einem moderaten Abfall der IGF2-Expression zu führen scheint.



RasGRF1 wie auch STAT4 werden verstärkt exprimiert. Thymosin β 15b und Betacellulin zeigen keine veränderte Expression. Parakrine oder autokrine IGF2-Stimulation scheint hingegen die zelleigene IGF2-Expression zu steigern (etwa um den Faktor 8).

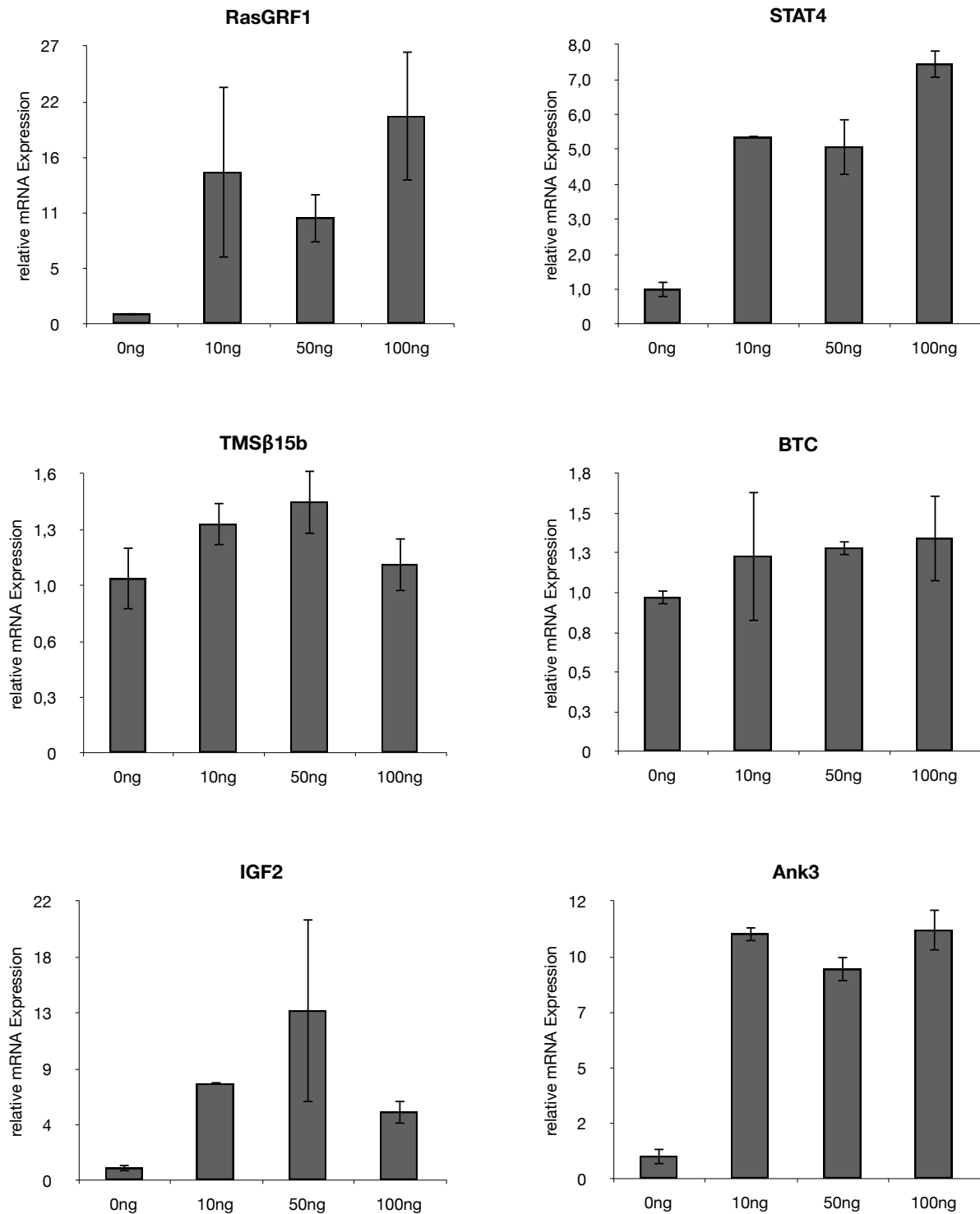


Abb. 3.22 Expression der Kandidatengene nach 26-stündiger IGF-Stimulation; im Vergleich wurde die RNA von nativen SK-OV-3 Zellen sowie nach Behandlung mit 10, 50 und 100ng/ml IGF2 isoliert und nach cDNA-Synthese mittels Real-time PCR analysiert; die Werte wurden mittels ΔC_t -Methode auf das *housekeeping*-Gen GAPDH bezogen; das Experiment wurde wiederholt in Duplikaten durchgeführt.

Besonders auffällig ist die deutliche Zunahme (11,5-fach) der Ankyrin 3 Expression. Dies passt zu der Erkenntnis, dass sich die CapG Expression in Ovarialkarzinomzellen invers verhält zur Expression von Ank3 und IGF2 (Kapitel 3.12.).

Eine Untersuchung der Zelllinie SK-OV-3 nach nur zweistündiger IGF2-Stimulation, ebenfalls in einer Konzentrationsbreite von 0 bis 100ng/ml IGF2, zeigte keine vergleichbaren Ergebnisse. Das Expressionsmuster blieb über alle Konzentrationen unverändert.

4. Diskussion

Das Ovarialkarzinom ist mit 3,5% aller Neubildungen der Frau und damit 7790 Erkrankungsfällen pro Jahr (Robert-Koch-Institut, Stand 2010) die fünfthäufigste Krebstodesursache (5,6%) in Deutschland. Für das Jahr 2014 wurden 7500 Fälle prognostiziert. Besonders problematisch ist dabei die Tatsache, dass der Tumor zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zumeist weit fortgeschritten ist und in ca. 75% der Fälle die Grenzen des Ovars, entsprechend FIGO Stadium 2, überschritten hat [Yap et al. 2009]. Die Ausbreitung des epithelialen Ovarialkarzinoms erfolgt dabei nicht, wie dies beim Mammakarzinom der Fall ist, vorrangig durch Metastasierung z.B. in Lunge und Leber, sondern breitet sich zunächst lokal destruierend im kleinen Becken aus. Tumoröse Absiedlungen, die sogenannte Peritonealkarzinose, entstehen hierbei entlang natürlicher Ausbreitungswege. Darüber hinaus können im Verlauf der Erkrankung Lymphmetastasen pelvin wie auch paraaortal entstehen und sich, jedoch seltener, auch in Organen wie Lunge und Leber absiedeln.

Die gesteigerte Zellmotilität als Grundlage für die Ausbreitung von entarteten Zellen sollte in dieser Arbeit betrachtet werden. Im Vordergrund stand hierbei die Rolle des Aktin bindenden Proteins CapG, welches bereits in unterschiedlichen Tumorentitäten als Onkogen identifiziert werden konnte [Lal et al. 1999; Dahl et al. 2005; Thompson et al. 2007; Nomura et al. 2008; Shao et al. 2011]. Seine Eigenschaft, sowohl zytosolisch über das *capping* von Aktinfilamenten direkt auf Zellmotilität Einfluss zu nehmen, als auch möglicherweise indirekt über die Lokalisation im Zellkern [Onoda et al. 1993] Einfluss auf Motilität, Differenzierung und damit Malignität zu nehmen, macht CapG zu einem interessanten Protein im Hinblick auf die Prävention und Therapie des Ovarialkarzinoms.

4.1. CapG-Expression korreliert mit Invasionsverhalten

Quantitative Real-time PCR Analysen sollten zunächst zeigen, ob CapG im Ovarialkarzinom eine differenzielle Expression zeigt. Dies war bereits infolge einer Microarray Analytik postuliert worden [Partheen et al. 2008], konnte allerdings bisher nicht bestätigt werden [Partheen et al. 2009]. Dazu wurde RNA aus 30 Tumorproben isoliert, cDNA synthetisiert und für die PCR in Duplikaten verwendet.

Von diesen 30 Tumorproben zeigten 30% eine Überexpression von mehr als 2,1-fach der Durchschnittsexpression bei dem Referenzkollektiv (und liegen damit oberhalb der

Standardabweichung). In der Folge galt es, funktionell onkogene Eigenschaften des CapG Proteins aufzudecken.

Für die Real-time PCR wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) als *housekeeping*-Gen gewählt. Dieses zeigt unter allen konstitutiv exprimierten Kontrollgenen eine gute Stabilität und Gleichverteilung, so dass es als Bezugsgröße eine möglichst große Ergebnisreliabilität und -reproduzierbarkeit garantiert [Vandesompele et al. 2002]. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode in vergleichbare Absolutwerte umgewandelt und jeweils auf die konstante Expression von GAPDH bezogen.

Ziel war es nun, experimentelle Ansätze zu etablieren, die Untersuchungen zur CapG-Funktion in Ovarialtumoren ermöglichen. Dazu wurden zunächst OvCa Zelllinien auf ihre CapG-Expression mittels RT-PCR untersucht, um Zellen mit hoher bzw. niedriger CapG-Expression zu identifizieren und nachfolgend vergleichend analysieren zu können. SK-OV-3 zeigte dabei eine 14,9-fach höhere CapG-Expression als Hey-Zellen. Im Vergleich mit der durchschnittlichen CapG-Expression in Ovar-Normalgeweben bedeutet dies eine etwa 2-fach höhere CapG-Expression in SK-OV-3 und eine 5-fach reduzierte CapG-Expression in der Zelllinie Hey.

Bereits mehrfach war CapG in Zusammenhang mit erhöhter Invasivität von Tumorzellen [Van den Abbeele et al. 2007], aber auch mit verstärkten Metastasierungsraten gebracht worden. De Corte et al. konnten bereits bei moderater Überexpression von CapG in Nierenepithelzellen eine verstärkte Invasivität in eine Kollagen I Matrix nachweisen. Dies wurde durch Versuche von Van den Abbeele bestärkt. Matrigel Invasionsassays zeigten ein reduziertes invasives Potential nach CapG-siRNA-vermittelter Reduktion der CapG-Expression („CapG *knockdown*“) in Mamma-Ca- und Pankreaskarzinom-Zelllinien (MDA-MB-231 und PC-3).

Das Ovarialkarzinom ist ein aggressives Malignom, welches sich durch klinisch unbemerkbare (okkulte), frühe Invasivität auszeichnet. Eine mögliche Abhängigkeit dieses Invasionsverhaltens von der CapG-Expression, die u.a. beim Mamma-Ca bereits verifiziert werden konnte [De Corte et al. 2004; Seier 2009], sollte im Folgenden untersucht werden.

Zunächst wurde das invasive Potenzial der beiden nativen Zelllinien Hey und SK-OV-3 mit dem Matrigel Invasionsassay untersucht. SK-OV-3 Zellen mit hoher CapG-Expression zeigten verglichen mit den Hey Zellen mit niedriger CapG-Expression ein deutlich ausgeprägteres Invasionsbestreben. Um den Zusammenhang von CapG und

Invasivität darzustellen, wurde in SK-OV-3 Zellen die CapG-Expression durch CapG siRNA-Behandlung reduziert, in Hey Zellen durch Transfektion mit einem CapG-Expressionsvektor gesteigert (Kap. 2.3.4. und 2.3.5.) und versucht, deren Migrationspotenzial und Invasivität vor und nach Modulation der CapG-Expression zu vergleichen (Kap. 3.5.).

Da Zellmigration die notwendige Voraussetzung für Invasion und auch das Metastasierungsverhalten ist, sollte im Folgenden zunächst die Mobilität der Zellen in Abhängigkeit von der CapG-Expression untersucht werden. Im Wundheilungsassay, dem Scratch-Assay, konnte eine verminderte Migrationstendenz nach Unterdrückung der CapG-Expression in SK-OV-3 Zellen gezeigt werden. Andersherum zeigte sich eine deutlich gesteigerte Mobilität der CapG-transfizierten Hey Zellen nach 72-stündiger Beobachtungszeit ($p=0,0004$ bzw. $<0,0001$).

In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss der differentiellen CapG Regulation im Invasionsassay analysiert. Dabei gelang es wiederholt nicht, in der CapG Transfektante Hey eine gesteigerte Invasivität nachzuweisen. Obwohl sich der Assay zuvor mit nativen Hey Zellen reproduzierbar hatte durchführen lassen, waren die vorliegenden Experimente aufgrund des Zellsterbens von Hey Transfektanten während der Durchführung nicht auswertbar. Dabei blieb unklar, ob es sich um methoden- oder zellspezifische Probleme handelte. Eine mögliche Diskrepanz zwischen Resultat von Migrations- und Invasionsassay ist allerdings in Pankreaskarzinomzellen vorbeschrieben [Thompson et al. 2007]. Eine siRNA-vermittelte Reduktion der CapG-Expression führte hier in zwei von drei untersuchten Zelllinien zu verminderter Zellwanderung im Invasionsassay, aber nur in einer davon konnte zusätzlich auch eine verminderte Zellmigration, nachweisbar als verzögerter Spaltschluss im Wundheilungsassay (Migrationsassay) nachgewiesen werden.

Demgegenüber gelang der Nachweis einer Invasivitätsminderung durch siRNA vermittelten CapG *knockdown* in SK-OV-3 Zellen. In Matrigel Invasionsassays der CapG-siRNA behandelten Zellen konnte in wiederholten Experimenten eine Reduktion der Invasivität um durchschnittlich 78% verglichen mit unbehandelten SK-OV-3-Zellen gezeigt werden ($p=0,0008$). Zum Ausschluss unspezifischer Effekte durch die siRNA-Transfektion wurden zunächst zwei verschiedene siRNA Sequenzen verwendet, die jeweils dasselbe Resultat erbrachten. Darüber hinaus waren bereits im Rahmen von Versuchen mit der Zelllinie MDA-MB-231 verschiedene Sequenzen getestet, mit Kontrollen verglichen und bezüglich ihrer Spezifität bestätigt worden (N.Seier).

Dass CapG einen unabhängigen Einfluss auf Zellmotilität inne hat, wurde bereits nachgewiesen [Witke et al. 2001] und könnte als Erklärung hinlänglich sein, warum sich durch Expressionsänderung eine Steigerung bzw. Minderung der Mobilität im Migrationsassay zeigt. Hingegen sind für die Überwindung einer Membranbarriere (simuliert durch die BME-Matrix des Invasionsassays) zusätzliche Zelleigenschaften nötig. Es stellt sich daher die Frage, auf welche Weise CapG auf diesen Prozess Einfluss nimmt und ob möglicherweise einen Zusammenhang von subzellulärer Lokalisation und Funktion besteht (s. Kap. 4.2.).

Ein interessanter Ansatz für weitergehende Studien wäre die Untersuchung der gewanderten Zellen im Invasionsassay. Die Anfärbung dieser Zellen mittels Immunhisto- oder -zytochemie könnte dabei Aufschluss über das vermehrte Vorliegen von CapG Protein und im Besonderen dessen subzellulärer Lokalisation geben.

4.2. Subzelluläre Lokalisation von CapG

Bereits früh ist die Sonderstellung hinsichtlich der Lokalisation von CapG innerhalb der Proteine der Gelsolin-Familie erkannt worden [Onoda et al. 1993]. Neben wenigen anderen Proteinen wie z.B. Profilin [Valster et al. 2003] liegt CapG sowohl im Zytoplasma wie auch im Zellkern vor, wobei die Funktion in letzterem Kompartiment weitestgehend unaufgeklärt ist. Die Größe von 39kDa macht eine Translokation in den Kern durch passive Diffusion unwahrscheinlich. Im Gegensatz zu strukturverwandten Proteinen weist CapG keine nukleäre Exportsequenz (NES) am N-terminalen Ende auf. Nach Fusion mit der Exportsequenz von FragminP jedoch zeigte sich deutlich weniger CapG im Kern [Van Impe et al. 2003]. Besonders interessant ist hierbei, dass NES-gekoppeltes CapG in Invasionsstudien eine verminderte Invasivität zeigte als dies bei nativen Zellen mit hohem nukleärem CapG-Anteil der Fall war [De Corte et al. 2004]. Eine Mutation in der NES durch Austausch entscheidender Isoleucin-Reste führte wiederum zu einer vermehrten Akkumulation von CapG im Kern und gleichzeitig einer gesteigerten Invasivität.

Die Frage, ob die subzelluläre Lokalisation von CapG auch bei Ovarialkarzinom-Zellen in Zusammenhang mit dem Invasionsverhalten steht, sollte durch subzelluläre Fraktionierung von Zellen unterschiedlicher CapG-Expression, wie SK-OV-3, Hey und Hey/CapG-Transfektanten geklärt werden. Interessanterweise zeigte sich bei SK-OV-3 Zellen eine

homogen bikompartimentelle Verteilung des CapG Proteins, während in Hey Zellen CapG Protein überwiegend nukleär lokalisiert war.

Bei Hey Zellen zeigte sich ferner, dass nach CapG-Transfektion die nukleäre Bande relativ konstant blieb, wohingegen der zytoplasmatische Proteinanteil stark anstieg. Dies deutet darauf hin, dass das CapG Protein in Hey Zellen posttranslational vorwiegend in den Kern transportiert wird, allerdings bei Überexpression im Zytoplasma akkumuliert. Der Theorie von DeCorte et al. (s.o.) folgend, nach welcher Kern-CapG mit höherer Invasivität einhergeht, steht die vorliegende Beobachtung zunächst im Widerspruch zum Invasionsverhalten der Zelllinie, welches sehr gering ist. Basierend auf den Erkenntnissen von De Corte et al. müsste ein hoher nukleärer Anteil von CapG mit größerem Invasionspotenzial einhergehen. Die vorliegende Diskrepanz kann aber relativiert werden durch das grundsätzlich geringe Expressionsniveau von CapG in Hey. Diese Zelllinie exprimiert Gesamt-CapG schwach, d.h. dass die Absolutmenge von CapG trotz vorwiegender Kernlokalisation gering ist (im Vergleich ist die nukleäre Proteinbande von SK-OV-3 weiterhin stärker).

Der Anstieg der zytosolischen Fraktion nach Transfektion lässt vermuten, dass die Menge an Kern-CapG einer unbekannten Regulation unterliegt, aber möglicherweise auch durch Importmechanismen limitiert ist.

Interessanterweise zeigte sich das Migrationsverhalten in CapG Transfektanten um etwa 65% gesteigert. Während die nativen Hey Zellen ca. um ein Drittel langsamer zu migrieren scheinen als SK-OV-3 Zellen, wird der Prozess durch erhöhtes CapG v.a. im Zytosol beschleunigt. Dies kann höchstwahrscheinlich auf die zytosolische Funktion von CapG als capping Protein und damit einem Modulator der Zellbewegung zurückgeführt werden.

Um die Ergebnisse weiter zu verifizieren, wurde CapG in allen Varianten auch immunzytochemisch nachgewiesen. Hierbei bestätigten sich die Resultate der ImmunoBlot-Analysen.

4.3. Posttranslationale Modifikation

Bereits 1993 ist die Frage nach möglichen posttranslationalen Modifikationen von CapG, v.a. im Hinblick auf einen Zusammenhang mit der unaufgeklärten Kernlokalisation des Proteins, aufgekommen [Onoda and Yin 1993]. CapG wird an Serin- und Threoninresten phosphoryliert. Die Zugabe von Phosphatasen zeigte nach zweidimensionaler

Auftrennung des Gesamtproteins eine Abnahme der sauren, phosphorylierten Varianten. Dieser Vorgang war durch Okadainsäure umkehrbar. Beim Vergleich von zytosolischen und nukleärem CapG zeigte letzteres einen stärkeren Anteil phosphorylierter Varianten, wobei die funktionelle Relevanz dieser Modifikation bisher unklar bleibt. Die Menge des phosphorylierten CapG konnte dabei auf 25 +/- 7% geschätzt werden.

Hinsichtlich der subzellulären Verteilung des CapG Proteins in Hey Zellen stellte sich die Frage, inwieweit dieses Verteilungsmuster mit möglichen posttranslationalen Modifikationen in Verbindung gebracht werden kann.

Für die Analyse der CapG Proteinvarianten in der Zelllinie Hey wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt, eine Methode die eine hochauflösende Auftrennung der Proteinvarianten nach ihrem isoelektrischen Punkt ermöglicht, wobei auch die Spots mit einer IP-Differenz von nur 0,06 klar voneinander unterschieden werden konnten.

Interessant waren die Analysen des Spotmusters von CapG nach 2D-Gelelektrophorese. Dieses zeigte, zumindest zum Teil (s.u.), die charakteristischen Doppelspots [Thompson et al. 2007; Seier 2009]. Massenspektrometrische (MALDI-TOF) Analysen der CapG-Varianten in der Zelllinie MDA-MB-231 hatten ergeben, dass die Doppelspots im Bereich von 5,88 bis 5,82 und ebenfalls bei den sauren Spots im Bereich von 5,69 bis 5,66 auf einen single nucleotide polymorphism (SNP) an der Stelle 335 im Exon 10 des CapG Gens zurückzuführen ist. Hier liegt bei der basischeren Variante ein Arginin (Spots 1R, 2R, 3R, s. Abb. 4.2), bei der saureren Variante jedoch die Aminosäure Histidin vor, was zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punkts um 0,06 führt. Diese Veränderung der Sequenz hat zur Folge, dass u.a. das Erkennungsmotiv (RES- Arginin/Glutamat/Serin) für die Phosphokinase C zerstört wird und die Histidin-Variante somit nicht am Serinrest (337) phosphoryliert werden kann. Dies erklärt das Fehlen des letzten Doppelspots (4H) in der 2D-Gelelektrophorese (s. Kap. 3.8., Abb. 3.15).

Die Annahme, dass die posttranslationale Modifikation von CapG einen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung hat [Seier 2009], machte die Zelllinie Hey mit fast ausschließlich nukleär vorliegendem CapG Protein zu einem geeigneten Kandidaten, um das möglicherweise veränderte Vorliegen solcher Modifikationen zu überprüfen. Auffällig war jedoch, dass das erwartete Doppelspot-Muster nur teilweise nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich mit der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231, die ebenfalls heterozygot für den SNP rs6886 ist und demnach sowohl für die Histidin- als auch die Arginin-Variante kodiert, konnte keine vollständige Übereinstimmung gefunden werden.

Durch Vergleichsanalysen der isoelektrischen Punkte beider Zelllinien konnten für CapG in Hey Zellen folgende Varianten identifiziert werden: die Varianten mit dem basischsten IP bildeten 2R und 2H, im saureren Bereich konnten die Varianten 3R und 4R nachgewiesen werden, welche den Hauptanteil des vorliegenden CapG Proteins bildeten. Der Spot 3H, entsprechend einer phosphorylierten Histidin-Variante, konnte nicht detektiert werden. Ebenfalls fehlten die N-terminal verkürzten Varianten 1R, 1H, 1Rs und 1Hs. Diese müssten ihren isoelektrischen Punkt im basischeren Bereich haben, da es durch die Abspaltung der ersten drei bzw. sechs Aminosäuren nicht zu einer Acetylierung des Methionins kommt, welches einen saureren IP bewirkt. Das Fehlen dieser verkürzten Proteinvarianten passt zu der Hypothese, dass die N-terminale Verkürzung durch Phosphorylierung unterdrückt wird. Hinweise dafür, dass der N-Terminus eine entscheidende Rolle für den Eintritt von CapG in den Zellkern spielt, liefern die Ergebnisse von De Corte et al. [De Corte et al. 2004]. Demnach verhindert das Anhängen einer GFP-Sequenz an den N-terminalen Bereich des Proteins das Eintreten in den Nukleus. Hingegen hatte das Anhängen der Sequenz an den C-Terminus keinen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung des CapG-Proteins.

Der hohe Phosphorylierungsgrad und die fehlenden N-terminal verkürzten Varianten, die nicht in den Zellkern translozieren, könnten das Vorliegen eines hohen nukleären CapG-Anteils erklären.

4.4. Histidin-Variante des SNP rs6886 in Ovarial- und Tubenkarzinom erhöht

Der Basen-Austausch von Adenosin zu Guanin an der Position 1254 im CapG Gen (Exon 10) führt zum Einbau der Aminosäure Arginin (R) anstelle von Histidin (H). Dies hat das Ausbleiben der Phosphorylierung an Serin₃₃₇ zur Folge. Die CapG Sequenzvariante R1254H ist als SNP rs6886 bekannt (Referenz der dbSNP). Dieser SNP ist bereits mit einem erhöhten Risiko für Atherosklerose in Verbindung gebracht worden [Burillo et al. 2009]. Dabei waren Makrophagen mit oxidiertem LDL behandelt und anschließend mittels 2D-Gelelektrophorese analysiert worden. Der Doppelspot wurde durch MS-Analytik als Arg335His-Polymorphismus erkannt. In einer Assoziationsstudie stellte sich heraus, dass das rezessive Allel (A) mit einer geringeren Intima-Media-Dicke (IMT, engl. intima media thickness) assoziiert zu sein scheint und damit mit einem geringeren Risiko für Atherosklerose korreliert.

In der vorliegenden Arbeit wurden 262 Fälle (Blut-DNA von Patientinnen mit Ovarial-Ca) mit 107 Kontrollen (gesunde Frauen ähnlichen Alters) hinsichtlich der Allelfrequenz im SNP rs6886 verglichen. Auffällig war der erhöhte Anteil der homozygot für die Histidin-Variante (A/A) kodierenden Proben (16% bei den Fällen vs. 10% unter den Kontrollen), wobei der Anteil der homozygoten Arginin-Varianten (G/G) im Vergleich zu den Gesunden abnahm. Es scheint demnach einen Zusammenhang zwischen Histidin-Variante und Tumorentwicklung zu geben.

Sehr deutlich war der Unterschied beim Tubenkarzinom. Diese Tumorentität ist besonders selten und es standen daher leider nur 12 DNA-Proben zur Verfügung. Eine größere Probenzahl wäre hier zur Validierung des Ergebnisses erforderlich.

Mit 50% aller Proben lag eine deutliche Dominanz der homozygoten Histidin-Variante (A/A) vor, wobei hier v.a. der Heterozygoten-Anteil deutlich verringert war (8% gegen 42% bei den Kontrollen). Demnach würde CapG beim Eileiterkarzinom zumindest an einer Phosphorylierungsstelle (Serin₃₃₇) hauptsächlich dephosphoryliert vorliegen. Dies passt funktionell zunächst nicht zu der Annahme u.a. von De Corte et. al., dass die Phosphorylierung in Zusammenhang mit Tumorgenese und erhöhtem Tumorstadium steht.

Die auffällige Allelverteilung des SNP rs6886 in Tuben- sowie Ovarial-Ca wirft die Frage nach einem Zusammenhang dieser beiden Tumorentitäten auf, denn im Gegensatz zu diesen zwei Malignomen konnte bei Mamma-Ca Proben kein Unterschied zum Normalkollektiv nachgewiesen werden [Seier 2009].

Diese Frage wird besonders vor dem Hintergrund interessant, dass sich in den letzten Jahren die Evidenz erhöht, dass ovariale Tumorzellen ihren Ursprung in der Tube, explizit in den Fimbrien der Tube haben [Salvador et al. 2009]. Im Zuge von Untersuchungen bei Frauen mit genetisch erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms haben sich charakteristische Läsionen v.a. in den Fimbrien der Tube gezeigt, sogenannte STICs (engl. serous tubal intraepithelial carcinoma), wohingegen das Ovargewebe keinerlei Auffälligkeiten aufwies [Kurman and Shih 2010]. Diese STICs waren ebenfalls in 70% der sporadischen ovariellen und peritonealen serösen High-grade-Karzinomen auffindbar und stehen daher vermutlich im Zusammenhang mit sporadischen OC wie auch den familiären OC von BRCA-Mutationsträgerinnen [Przybycin et al. 2010]. Dies gilt unter den Tumoren epithelialen Ursprungs zunächst für das seröse Ovarialkarzinom. Aktuelle Studien haben außerdem gezeigt, dass die operative Ligatur des Eileiters als Sterilisationsmethode eine signifikante Reduktion von Ovarialkarzinomen zur Folge hat. Die Risikoreduktion beträgt demnach 34% und gilt

histologisch für das endometroide und seröse OC, nicht aber für das muzinöse [Cibula et al. 2011].

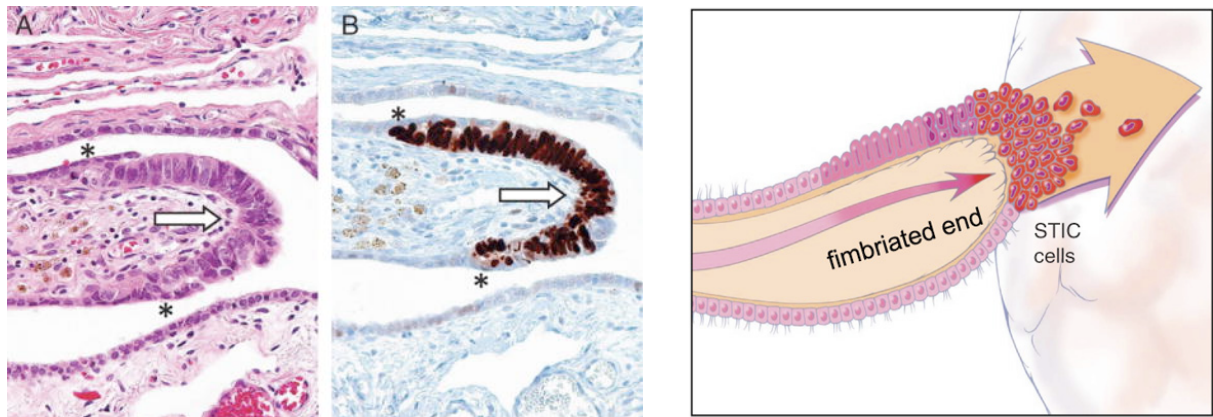


Abb. 4.1 Translokation von STIC Zellen aus den Fimbrien der Tuba uterina ins Ovar [Kurman and Shih le 2010]; links: HE-Färbung des STIC (A) und die immunhistologische Färbung von p53 (B). Das Ende der Läsion ist mit einem Sternchen gekennzeichnet. Rechts: Schemazeichnung der direkten STIC-Zell-Dissemination auf die die Oberfläche des Ovars. Hier bildet sich eine Tumormasse, deren Ursprung als ovarial erkannt werden kann.

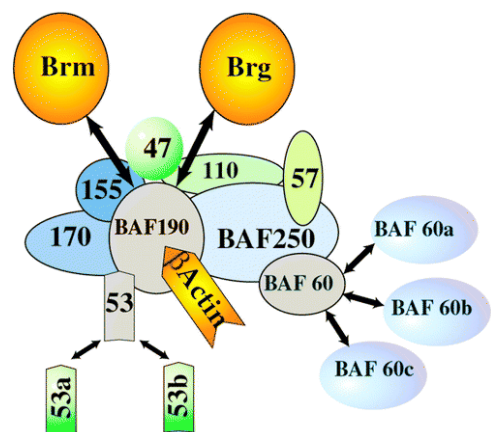
Als Protein mit motilitätsfördernden Eigenschaften scheint CapG, welches im OC wie auch im Tuben-Ca überexprimiert wird, in diesem Zusammenhang interessant zu sein. Möglicherweise spielt es bei der Entwicklung des OC eine Rolle, in dem es an der Zellwanderung aus der Tube in das Ovar beteiligt ist. Inwieweit die Regulation der Phosphorylierung z.B. durch den hier beschriebenen auffälligen Polymorphismus dabei eine Rolle spielt, kann in diesem Rahmen nicht aufgeklärt werden. Es muss angenommen werden, dass unterschiedliche Mechanismen bei der Regulation von CapG zusammenwirken, wobei die genetische Disposition z.B. durch Vorliegen der homozygoten Histidin-Variante und des dadurch herabgesetzten Phosphorylierungsgrades ein möglicher Teilfaktor bei der Wanderung von Tumorzellen sein könnte. Inwieweit diese posttranslationale Modifikation funktionell eine Rolle spielt, wird zukünftig noch zu klären sein. Für die Untersuchungen am Tuben-Ca wird ein größeres und hinsichtlich klinischer Daten sorgfältig dokumentiertes Kollektiv benötigt werden. Ließe sich ein derart starker Zusammenhang von Tuben-Ca und SNP rs6886 mit größeren Fallzahlen reproduzieren, könnte dieser Polymorphismus bei der Früherkennung tubarer aber auch ovarialer Tumoren wichtig werden.

4.5. Mögliche Interaktion von CapG mit IGF2 und Ank3

Die Lokalisation des CapG Proteins im Kern sowie der Zusammenhang von CapG mit erhöhter Invasivität hat die Frage nach der funktionellen Bedeutung des CapG Proteins im Kern aufgeworfen. Auf verschiedenen Wegen wurde bereits über eine CapG-abhängige Modulation der Genexpression spekuliert. Unter anderem spielt dabei eine Verbindung über Kern-Aktin eine Rolle [Egly et al. 1984]. Aber auch direkte Zusammenhänge scheinen möglich. Zumal andere, strukturverwandte ABP wie zum Beispiel Supervillin ebenfalls in der Modulation von Expressionsmustern mitwirken [Ting et al. 2002].

Lange war die Existenz von nukleärem Aktin umstritten. Seither haben diverse Studien das Vorliegen von Kern-Aktin in verschiedenen Spezies (in Hefe, Drosophila und im Menschen) bestätigt. Es ist u.a. Teil verschiedener Transkriptionsregulationskomplexe aus der Familie der SWI/SNF-Komplexe [Olave et al. 2002]. Einer darunter, der sogenannte BAF-Komplex, ist assoziiert mit Brg1-abhängigen ATPasen, wobei die Bindung von Aktin an Brg1 z.T. PIP₂-abhängig ist. Die Funktion dieses Komplexes und die Rolle von Aktin und damit auch der nukleären ABP ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Der BAF-Komplex scheint das Zellwachstum zu hemmen, u.a. durch Bindung des Rb-Tumorsuppressor-Proteins über eine Brg1-Untereinheit [Strober et al. 1996].

Abb. 4.2 Humaner BAF-Komplex im Zellkern [Olave et al. 2002] reguliert Chromatin-Konformation und steht in direktem Zusammenhang mit Transkriptionsaktivität. Der Komplex enthält β -Aktin und kann möglicherweise durch Aktin-Polymerisation reguliert werden.



Dies unterstreichend wurde er in verschiedenen selteneren Tumorentitäten als inaktiviert identifiziert [Muchardt and Yaniv 1999]. *In vitro* konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Mutation durch Basenaustausch im Aktin-Gen die Polymerisation unterbindet und zur Transformation der Zelle führt. Wenn also eine Blockade der Polymerisation von Kern-Aktin möglicherweise zur Blockade der BAF-Komplexaktivität und somit zur zellulären Transformation führt, scheint die Funktion von Aktin-capping-Proteinen wie CapG eine wichtige regulative Rolle innehaben zu können. Denn wie auch

im Zytoplasma führt dieses *capping* von Aktin dazu, dass die Bindung von weiteren Aktinmonomeren unterbleibt. Dies wird unterstützt durch die Hypothese von Gettemans et al., nach der CapG von Aktin dissoziieren muss, um die Bindung von Aktin an den BAF-Komplex zu ermöglichen und es dadurch direkten Einfluss auf die Chromatin-Kondensation nimmt [Gettemans et al. 2005].

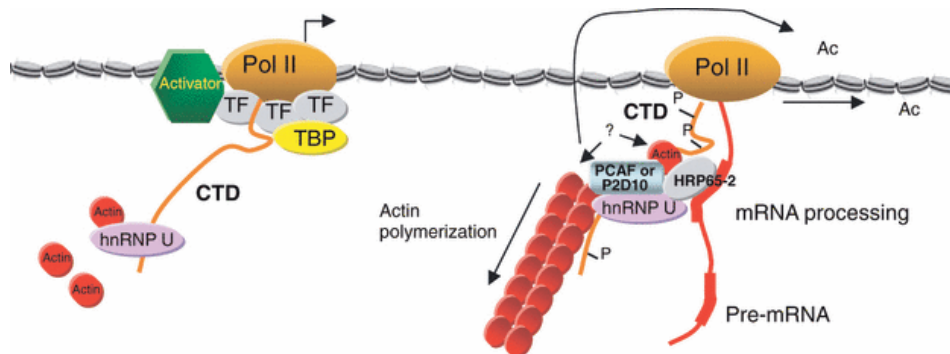


Abb. 4.3 Beteiligung von Aktin an der Bildung von Pre-mRNA im Zusammenspiel mit RNA-Polymerase II [Zheng et al. 2009]

Die Länge des Aktinpolymers nimmt Einfluss auf die Funktion des Preinitiationskomplexes.

Aktuelle Untersuchungen ergaben außerdem, dass Aktin auch bei der Transkription aller drei RNA-Polymerasen (Pol I-III) beteiligt ist. Es fungiert u.a. im Preinitiationskomplex (PIC) der Pol II und spielt sowohl bei der Initiation wie auch bei der Elongation der Transkription eine Rolle [Hofmann et al. 2004; Zheng et al. 2009]. Desweiteren bildet es einen nukleären Komplex mit HAT (Histon-spezifische Acetyltransferase) und HRP65-2, welcher Chromatin in einer transkriptionskompatiblen Konformation erhält. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls eine Abhängigkeit der Funktion des Komplexes vom Aktin-Polymerisierungsgrad postuliert [Percipalle et al. 2006]. Zusammenfassend kann demnach von einer Rolle von CapG innerhalb der Transkriptionsregulation unbekannter Gene ausgegangen werden.

Dies sollte durch die vorliegende DNA-Chip-Analyse (Kap 1.4.) untersucht werden und ergab über 100 differenziell regulierte Gene gleich- oder gegensinnig zur CapG-Expression. Die Experimente wurden durchgeführt mit Mammakarzinom-Zelllinien, wobei die CapG-Expression in MDA-MB-231 durch siRNA-Interferenz reduziert und in BT-20 mittels stabiler Transfektion gesteigert wurde. Berücksichtigt wurden bei der engeren Auswahl nur Gene, die im Hinblick sowohl auf CapG Reduktion als auch Überexpression

eine gleichgerichtete oder inverse Expressionsänderung zeigten (C.Schleithoff, Molekulargenetisches Labor der Frauenklinik am UKD, unveröffentlichte Ergebnisse).

Analog zu den Arbeiten beim Mammakarzinom sollte nun die CapG-abhängige Expression potenzieller CapG-Zielgene in Ovarialkarzinomen untersucht werden. Die Auswahl der Zielgene erfolgte nach festen Kriterien, wobei ein Zusammenhang mit Invasivität, Zellproliferation, Metastasierung und Ovarialkarzinom bestehen sollte.

Zunächst wurde die Expression der ausgewählten Gene in Abhängigkeit der CapG-Expression in verschiedenen Zelllinien (Ovarial-Ca, Mamma-Ca und Endometrium- bzw. Zervix-Ca) charakterisiert. Insgesamt waren die Ergebnisse in dieser vergleichenden Analyse verschiedenster Zelllinien erwartet heterogen. Im Überblick war ein Trend im Sinne der Ergebnisse der Microarray-Analyse zunächst bei den Mamma-Ca Zelllinien bei einigen Genen erkennbar. Für die STAT4- und BTC-Genexpression konnte man eine gleichsinnige, im Falle von IGF2 eine inverse Assoziation mit der CapG Expression erkennen.

Bei den vier Ovarial-Ca Zelllinien war die Expression von RasGRF1 und STAT4 im Trend mit der CapG-Expression direkt, für Ank3 und Thymosin β 15b invers assoziiert, für IGF2 konnte kein Zusammenhang beobachtet werden. Diese Untersuchungen dienten zunächst lediglich der Charakterisierung dieser Zelllinien bzgl. der CapG- und Zielgen-Expression. Aufgrund der Diversität dieser Zelllinien lassen sich scheinbare Zusammenhänge im Sinne der Fragestellung nur bedingt interpretieren.

Aus diesem Grund wurde ein Vergleichssystem mit den Zelllinien Hey und SK-OV-3 geschaffen. Deren CapG-Expression wurde jeweils gesteigert bzw. reduziert, um mögliche Auswirkungen dieser Expressionsmodulation auf die Expressionsprofile der potenziellen Target-Gene mittels RT-PCR Analyse detektieren zu können.

Zunächst konnte durch stabile Überexpression in Hey-Zellen die CapG-Expression um das 236-fache gesteigert werden. Hingegen führte die Reduktion der CapG-Expression durch siRNA-Behandlung der SK-OV-3 Zellen nur zur Minderung um den Faktor 5. Lediglich die IGF2 Expression zeigte eine deutliche inverse Regulation zu CapG. Nach *knockdown* von CapG war die IGF2-Expression 3,2-fach gesteigert. Überexpression führte zu 1,4-facher Herabregulation der IGF2-Expression.

Dies schien verwunderlich, da IGF2 in vielen Tumoren als onkogener Wachstumsfaktor beschrieben wurde und man unter der Annahme, dass CapG als Onkogen bei der Tumorgenese des Ovarialkarzinoms beteiligt ist, eher eine gleichsinnige Expressionsverteilung vermuten würde. Interessant allerdings ist die Tatsache, dass IGF2 ein Ligand

verschiedener Rezeptoren ist und seine Funktion durch die Bindung an diese definiert wird. Die onkogene Eigenschaft wird über die Bindung an die proliferationsfördernden Rezeptoren von IGF1 und dem Insulin-Rezeptor selbst vermittelt. Hingegen führt die Bindung an den IGF2-Rezeptor (M6P/IGF2-R) zu verminderter bzw. verzögerter Tumorentwicklung, da dieser als Tumorsuppressor identifiziert wurde [Martin-Kleiner and Gall Troselj 2010]. Es wäre also interessant, den Rezeptorstatus bei OC-Proben zu ermitteln. Dieser könnte Aufschlüsse darüber geben, über welchen Signalweg von IGF2 die Tumorentwicklung positiv oder negativ beeinflusst wird.

Für Ankyrin 3 konnte nach CapG *knockdown* in SK-OV-3 Zellen eine um das 7,8-fach gesteigerte Ank3-Genexpression gezeigt werden. Das membranständige Zell-Adhäsionsprotein Ank3 zeigte in den Zelllinien wie auch bei der Analyse der CapG-modifizierten Linien SK-OV-3 und Hey eine inverse Expressionskorrelation. Dies steht im Einklang mit der physiologischen Funktion von Ank3. Während CapG die Zellmigration stimuliert, fördert Ank3 im Gegensatz dazu den Verbleib der Zellen im Zellverband. Ank3, auch Ankyrin G genannt, ist ein wichtiger Mediator bei der Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten an der lateralen Membran von epithelialen Zellen. Es bindet E-Cadherin direkt und rekrutiert β -2-Spektrin zu einem E-Cadherin- β -Catenin-Komplex [Kizhatil et al. 2007]. Darüber hinaus ermöglicht es gemeinsam mit β -2-Spektrin die intrazelluläre Freisetzung von E-Cadherin aus dem Golgi-Apparat. In den letzten Jahren ist die Rolle von E-Cadherin bei der Entwicklung von Tumoren, insbesondere bei der Dissemination von Tumorzellen, deutlich geworden [Schmalhofer et al. 2009]. Eine verminderte Expression von E-Cadherin führt zu einer verstärkten Invasivität und damit zu maligner Entwicklung des Neoplasmas.

Ankyrin 3 könnte also eine Rolle bei der Vermittlung zwischen Aktin-Zytoskelett und Adhäsion spielen, indem die herabgesetzte Ank3-Expression in Ovarialkarzinomen das Lösen der entarteten Zellen vom Zellverband ermöglicht. Dies korreliert mit der These, dass auch E-Cadherin bei metastasierenden ovarialen Tumorzellen im Gegensatz zum soliden Primärtumor vermindert exprimiert wird [Lengyel 2010]. Erklärt wird dieser Vorgang durch die zelluläre Transition von epithelial zu mesenchymal (EMT; engl. *epithelial to mesenchymal transition*), wobei interzelluläre Adhäsionen zwischen den Tumorzellen sowie auch zur Basalmembran gelöst werden, um eine Invasion bzw. Metastasierung der entarteten Zellen zu ermöglichen [Kalluri and Weinberg 2009].

Diese bei den vier untersuchten OvCa-Zelllinien beobachtete Tendenz im Expressionsverhalten von Ank3 und IGF2 sollte dann in einem größeren Probenkollektiv getestet werden.

Verwendet wurden Ovarialkarzinom Gewebeproben von 30 Patientinnen, als Kontrolle dienten 15 Proben von Frauen in vergleichbarer Altersspanne.

Das Expressionsprofil von Ank3 wie auch von IGF2 ergab keine statistisch signifikante Korrelation mit der CapG-Expression (Kapitel 3.12.). Die Expressionsprofile entsprechen demnach nicht denen des CapG innerhalb dieses Probenkollektivs. Dies schließt einen regulatorischen Einfluss untereinander jedoch nicht aus. Zwischengeschaltete Faktoren können eine Rolle spielen, die bei dieser Analyse nicht detektiert werden können.

Bei der Gesamtanalyse der Expressionsdaten zeigte sich zunächst (s.o.), dass die CapG-Expression im Tumorkollektiv gegenüber dem Normalkollektiv durchschnittlich um den Faktor 2 erhöht ist.

Ankyrin 3 hingegen zeigte eine im Durchschnitt auf die Hälfte reduzierte Expression unter den Tumorproben im Vergleich mit der Expression im Referenzkollektiv. Dies passt zu der Vermutung, dass es im Tumor grundsätzlich invers zu CapG reguliert wird. Da aber die einzelnen Expressionswerte nicht direkt in Verbindung zu den CapG-Expressionen zu stehen scheinen, kann eine direkte Regulation durch CapG selbst nicht angenommen werden.

Auffällig bei der Auswertung der IGF2-Daten waren diejenigen Tumoren, deren klinische Daten eine hohe Tumorprogression, d.h. $\geq$ Grade 3, mit oder ohne Metastasen (M+/-) und mit Befall der lokalen Lymphknoten, ergaben. Hier lag IGF2 stark überexprimiert vor. Dies deckt sich mit den Daten von Lu et al., welche einen Zusammenhang von IGF2 mit dem Tumorstadium postuliert hatten [Sayer et al. 2005; Lu et al. 2006]. Insofern kann IGF2 als weiterhin Promotor einer verstärkten Tumorgenese angenommen werden. Funktionell mag dieser Wachstumsfaktor jedoch eine andere Rolle, möglicherweise auch zeitlich im Verlauf der Tumorentwicklung betrachtet, spielen als CapG und wird möglicherweise deshalb bei erhöhtem CapG niedriger exprimiert.

4.6. Einfluss von IGF2 auf das Expressionsprofil bei SK-OV-3

Die vorliegenden Ergebnisse hatten eine Assoziation von CapG- und IGF2-Expression im OvCa Probenkollektiv vermuten lassen. Nicht ersichtlich ist dabei allerdings, in welchem Verhältnis die untersuchten Gene stehen. Die Frage, ob IGF2 selbst ebenfalls

Einfluss auf die Expression von CapG nimmt und möglicherweise als zwischen- oder vorangestelltes Glied einer Regulationskette mit der Expression der anderen Kandidatengene in Verbindung gebracht werden kann, war der Anstoß für die folgende Untersuchung.

Für die Stimulation der SK-OV-3 Zellen mit unterschiedlichen IGF2-Konzentrationen scheint grundsätzlich zu gelten, dass geringere Mengen von IGF2 (10ng/ml) denselben Effekt auf die Expression der untersuchten Gene haben wie hohe Konzentrationen bis 0,1µg/ml.

RasGRF1 und STAT4 zeigten bereits bei 10ng/ml IGF2-Konzentration eine deutliche Expressionssteigerung (mehr als 10-fach, respektive 5-fach), die mit Anstieg von IGF2 nicht proportional anzuwachsen schien. Diese Steigerung kann auf ihre Funktion als Glieder einer Signalkette zurückgeführt werden, die durch die Phosphorylierung der Tyrosinkinase-Rezeptoren bzw. im Fall von STAT4 Januskinase-Rezeptoren aktiviert wird. RasGRF1 führt über Austausch von GDP zu GTP zur Aktivierung von Ras Protein [Olson and Marais 2000]. Dieses wiederum aktiviert verschiedene MAP Kinasen, welche teilweise in den Zellkern gelangen können um dort Transkriptionsprozesse zu beeinflussen [Cobb 1999]. Aktiviertes, d.h. phosphoryliertes STAT4 transloziert ebenfalls in den Zellkern und agiert dort als Transkriptionsregulator verschiedener Gene [Calo et al. 2003].

Betacellulin, selbst ein Wachstumsfaktor, dessen Target die HER-Rezeptoren sind, blieb in seiner Expression unverändert. Auch auf die Thymosinβ15b-Expression hatte die Stimulation keinen Einfluss. Dieses Protein ist über Bereitstellung von Aktin-Monomeren an zellulärer Bewegung beteiligt und damit funktionell dem CapG hinsichtlich seiner zytosolischen Funktion eng verwandt. Ein Einfluss im Sinne einer Expressionssteigerung durch onkogene Wachstumsfaktoren hätte also nicht verwundert, zumal Thymosinβ15b bereits mehrfach mit verstärkter Metastasierung in Verbindung gebracht wurde [Gu et al. 2008].

Sehr ausgeprägt war die Selbststimulation der IGF2-Expression selbst um ca. das 8-fache. Dies könnte auf einen positiven Rückkopplungsmechanismus zurückzuführen sein, wobei der IGF2-Ligand über den IGF1-Rezeptor die Expression von IGF2 in der Zelle steigert [Ligeza and Klein 2011]. Durch Blockade des IGF1-Rezeptors mit Tyrosinkinaseinhibitoren konnte dieser Mechanismus zur Wachstumsregulation in Prostatakarzinomzellen nachgewiesen werden.

Die Ank3-Expression zeigte sich um das ca. 11,5-fache gesteigert. Dies korreliert mit den Vorergebnissen, in denen IGF2- und Ank3-Expressionen beim Ovarial-Ca in ähnlichem Maße hoch und niedrig zu sein schienen (Kapitel 3.12.). Demnach fördert IGF2 funktionell den Zellverbund über Ank3.

Im Gegensatz dazu wurde die CapG-Expression unter IGF2-Stimulation reduziert. Im Durchschnitt war sie um das 2,3-fache verringert. Es scheint also ein inverses Expressionsmuster von CapG und IGF2 zu geben.

Einerseits führt die Überexpression von CapG zu verminderter IGF2-Expression, andererseits führt eine Stimulation mit IGF2 zu einer Reduktion der CapG-Expression.

Funktionell scheinen diese Gene unterschiedliche Rollen bei der Entwicklung des Ovarialkarzinoms innezuhaben. Es liegt die Vermutung nahe, dass CapG im Rahmen der Invasion und Metastasierung aktiv ist (Kapitel 4.1.), wohingegen IGF2 vor allem am Wachstum des Tumors, d.h. auch an der Stabilisierung der Tumorzellen als Zellverband über Ank3, beteiligt ist.

5. Zusammenfassung

In verschiedenen Tumoren, u.a. dem Mammakarzinom, konnte eine Überexpression des Aktin modulierenden Proteins CapG gezeigt werden. Es liegt im Zytoplasma wie auch im Nukleus vor. Eine Steigerung der Expression sowie auch der Grad der Phosphorylierung des CapG Proteins wurden mit erhöhter Invasivität und einem erhöhten metastatischen Potenzial in Verbindung gebracht.

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang von CapG und OvCa Zellen überprüft. 30% der untersuchten Tumorzellen zeigten eine Überexpression des CapG Gens. Zur Analyse des Invasionsverhaltens wurden zwei OvCa Zelllinien in ihrer CapG-Expression modifiziert. Eine Reduktion der endogenen CapG-Expression in der stärker invasiven Zelllinie (SK-OV-3) führte zu einer deutlich geringeren Invasivität. Auf der anderen Seite gelang der Nachweis einer durch CapG Transfektion gesteigerten Invasivität in Hey Zellen nicht.

Das Migrationsverhalten der beiden Zelllinien nach CapG-Expressionsänderung zeigte sich jedoch konkordant. Nach stabiler CapG-Transfektion war es deutlich gesteigert, hingegen nach Reduktion der CapG-Expression nachweislich verringert.

Invasive SK-OV-3 Zellen zeigten das typische Verteilungsmuster des CapG Proteins in Zytoplasma und Zellkern. Bei gering invasiven Hey Zellen lag dieses fast ausschließlich nukleär vor. Durch zweidimensionale Auftrennung des CapG Gesamtproteins in dieser Zelllinie konnte eine Abweichung von einem charakteristischen Doppelspotmuster gezeigt werden. Dieses liegt bei Zellen, die heterozygot bezogen auf die CapG Sequenzvariante an der Stelle R1254H des CapG Gens sind, normalerweise vor. Ein Überwiegen der Spots mit sauren IPs deutete auf das Vorliegen besonders vieler phosphorylierter CapG Varianten hin. Zudem fehlten die N-terminal verkürzten Varianten. Letzteres passte zu der Vermutung, dass Phosphorylierung eine N-terminale Abspaltung unterdrückt und andererseits mit vermehrter Translokation in den Kern assoziiert ist.

Die Assoziations-Analyse des Polymorphismus (SNP rs6886) in OvCa und Tüben Ca, welcher Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad des CapG Proteins nimmt, ergab eine deutliche, aber nicht signifikante Häufung des homozygoten, für die AS Histidin kodierenden Genotyps (A/A) im OvCa Kollektiv. Für das Tüben Ca zeigte sich dieser Zusammenhang als signifikant. Vor dem Hintergrund der aktuellen Forschung, wonach der Ursprung des serösen OvCas möglicherweise das Tübenepithel ist, könnte CapG eine wichtige Rolle bei der Zellwanderung spielen. Die von der Norm abweichende

Verteilung des Polymorphismus rs6886 im CapG Gen in Tuben- wie auch OvCa mag damit im Zusammenhang stehen.

Expressionsdaten, die einen direkten Zusammenhang von CapG-Expression und sechs möglicher Target-Gene im Mamma Ca vermuten ließen, konnten im OvCa nicht für alle sechs Gene nachvollzogen werden. Allerdings waren die Expressionsprofile von IGF2 (invers zur CapG-Expression) und Ank3 (ebenfalls invers) unter erhöhter bzw. verminderter CapG-Expression in zwei OvCa Zelllinien deutlich verändert. In einem OvCa Probenkollektiv mit 30 Tumorproben konnte zwar keine direkte Beziehung der Expressionsprofile von IGF2, Ank3 und CapG gezeigt werden. Die Stimulation einer OvCa Zelllinie mit IGF2 führte aber zu gesteigerten Expressionen der IGF2 und Ank3 Gene sowie einer verminderten Expression des CapG Gens. Die Untersuchungen legen nahe, dass CapG und IGF2/Ank3 in Ovarialkarzinomen einer inversen Expressionsregulation unterliegen.

6. Literatur

Archer, S. K., C. Claudianos, et al. (2005). "Evolution of the gelsolin family of actin-binding proteins as novel transcriptional coactivators." Bioessays 27(4): 388-396.

Arteaga, C. L. and C. K. Osborne (1989). "Growth inhibition of human breast cancer cells in vitro with an antibody against the type I somatomedin receptor." Cancer Res 49(22): 6237-6241.

Bennett, V. (1992). "Ankyrins. Adaptors between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm." J Biol Chem 267(13): 8703-8706.

Bennett, V. and A. J. Baines (2001). "Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues." Physiol Rev 81(3): 1353-1392.

Bourguignon, L. Y., H. Zhu, et al. (2000). "Ankyrin-Tiam1 interaction promotes Rac1 signaling and metastatic breast tumor cell invasion and migration." J Cell Biol 150(1): 177-191.

Buettner, R., L. B. Mora, et al. (2002). "Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention." Clin Cancer Res 8(4): 945-954.

Burillo, E., D. Recalde, et al. (2009). "Proteomic study of macrophages exposed to oxLDL identifies a CAPG polymorphism associated with carotid atherosclerosis." Atherosclerosis 207(1): 32-37.

Calo, V., M. Migliavacca, et al. (2003). "STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis." J Cell Physiol 197(2): 157-168.

Carlier, M. F. and D. Pantaloni (1997). "Control of actin dynamics in cell motility." J Mol Biol 269(4): 459-467.

Cass, I., R. L. Baldwin, et al. (2003). "Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma." Cancer 97(9): 2187-2195.

- Chen, L. M., S. D. Yamada, et al. (2003). "Molecular similarities between primary peritoneal and primary ovarian carcinomas." Int J Gynecol Cancer 13(6): 749-755.
- Choi, J. H., K. C. Choi, et al. (2004). "Overexpression of follicle-stimulating hormone receptor activates oncogenic pathways in preneoplastic ovarian surface epithelial cells." J Clin Endocrinol Metab 89(11): 5508-5516.
- Cibula, D., M. Widschwendter, et al. (2011). "Tubal ligation and the risk of ovarian cancer: review and meta-analysis." Hum Reprod Update 17(1): 55-67.
- Cobb, M. H. (1999). "MAP kinase pathways." Prog Biophys Mol Biol 71(3-4): 479-500.
- Dabiri, G. A., C. L. Young, et al. (1992). "Molecular cloning of human macrophage capping protein cDNA. A unique member of the gelsolin/villin family expressed primarily in macrophages." J Biol Chem 267(23): 16545-16552.
- Dahl, E., A. Sadr-Nabavi, et al. (2005). "Systematic identification and molecular characterization of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer." J Pathol 205(1): 21-28.
- De Corte, V., K. Van Impe, et al. (2004). "Increased importin-beta-dependent nuclear import of the actin modulating protein CapG promotes cell invasion." J Cell Sci 117(Pt 22): 5283-5292.
- Dunbar, A. J. and C. Goddard (2000). "Structure-function and biological role of betacellulin." Int J Biochem Cell Biol 32(8): 805-815.
- Egly, J. M., N. G. Miyamoto, et al. (1984). "Is actin a transcription initiation factor for RNA polymerase B?" EMBO J 3(10): 2363-2371.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, et al. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." Nature 411(6836): 494-498.
- Fathalla, M. F. (1971). "Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia?" Lancet 2 (7716): 163.

- Firat-Karalar, E. N. and M. D. Welch (2011). "New mechanisms and functions of actin nucleation." Curr Opin Cell Biol 23(1): 4-13.
- Gettemans, J., K. Van Impe, et al. (2005). "Nuclear actin-binding proteins as modulators of gene transcription." Traffic 6(10): 847-857.
- Gieni, R. S. and M. J. Hendzel (2009). "Actin dynamics and functions in the interphase nucleus: moving toward an understanding of nuclear polymeric actin." Biochem Cell Biol 87(1): 283-306.
- Gold, J. S., L. Bao, et al. (1997). "Localization and quantitation of expression of the cell motility-related protein thymosin beta15 in human breast tissue." Mod Pathol 10(11): 1106-1112.
- Gu, Y. M., S. Y. Li, et al. (2008). "Elevated thymosin beta15 expression is associated with progression and metastasis of non-small cell lung cancer." APMIS 116(6): 484-490.
- Guth, U., D. J. Huang, et al. (2007). "Metastatic patterns at autopsy in patients with ovarian carcinoma." Cancer 110(6): 1272-1280.
- Hild, G., B. Bugyi, et al. (2010). "Conformational dynamics of actin: effectors and implications for biological function." Cytoskeleton (Hoboken) 67(10): 609-629.
- Hofmann, W. A., L. Stojiljkovic, et al. (2004). "Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II." Nat Cell Biol 6(11): 1094-1101.
- Huff, T., C. S. Muller, et al. (2001). "beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions." Int J Biochem Cell Biol 33(3): 205-220.
- Imada, K. and W. J. Leonard (2000). "The Jak-STAT pathway." Mol Immunol 37(1-2): 1-11.
- Jazaeri, A. A., C. J. Yee, et al. (2002). "Gene expression profiles of BRCA1-linked, BRCA2-linked, and sporadic ovarian cancers." J Natl Cancer Inst 94(13): 990-1000.
- Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest 119(6): 1420-1428.

- Kizhatil, K., J. Q. Davis, et al. (2007). "Ankyrin-G is a molecular partner of E-cadherin in epithelial cells and early embryos." J Biol Chem 282(36): 26552-26561.
- Kowalski, L. D., A. I. Kanbour, et al. (1997). "A case-matched molecular comparison of extraovarian versus primary ovarian adenocarcinoma." Cancer 79(8): 1587-1594.
- Kurman, R. J. and M. Shih le (2010). "The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory." Am J Surg Pathol 34(3): 433-443.
- Kwiatkowski, D. J., P. A. Janmey, et al. (1989). "Identification of critical functional and regulatory domains in gelsolin." J Cell Biol 108(5): 1717-1726.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-685.
- Lal, A., A. E. Lash, et al. (1999). "A public database for gene expression in human cancers." Cancer Res 59(21): 5403-5407.
- Landen, C. N., Jr., M. J. Birrer, et al. (2008). "Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer." J Clin Oncol 26(6): 995-1005.
- Lengyel, E. (2010). "Ovarian cancer development and metastasis." Am J Pathol 177(3): 1053-1064.
- LeRoith, D., R. Baserga, et al. (1995). "Insulin-like growth factors and cancer." Ann Intern Med 122(1): 54-59.
- Leung, W. K., A. K. Ching, et al. (2011). "Phosphorylation of Caldesmon by PFTAIRE1 kinase promotes actin binding and formation of stress fibers." Mol Cell Biochem 350 (1-2): 201-206.
- Liang, C. C., A. Y. Park, et al. (2007). "In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro." Nat Protoc 2(2): 329-333.
- Ligeza, J. and A. Klein (2011). "Growth factor/growth factor receptor loops in autocrine growth regulation of human prostate cancer DU145 cells." Acta Biochim Pol 58(3): 391-396.

- Lu, L., D. Katsaros, et al. (2006). "The relationship of insulin-like growth factor-II, insulin-like growth factor binding protein-3, and estrogen receptor-alpha expression to disease progression in epithelial ovarian cancer." Clin Cancer Res 12(4): 1208-1214.
- Marks, J. R., A. M. Davidoff, et al. (1991). "Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer." Cancer Res 51(11): 2979-2984.
- Martin-Kleiner, I. and K. Gall Troselj (2010). "Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R) in carcinogenesis." Cancer Lett 289(1): 11-22.
- McDonald, D., G. Carrero, et al. (2006). "Nucleoplasmic beta-actin exists in a dynamic equilibrium between low-mobility polymeric species and rapidly diffusing populations." J Cell Biol 172(4): 541-552.
- McIntyre, E., E. Blackburn, et al. (2010). "The complete family of epidermal growth factor receptors and their ligands are co-ordinately expressed in breast cancer." Breast Cancer Res Treat 122(1): 105-110.
- Miralles, F. and N. Visa (2006). "Actin in transcription and transcription regulation." Curr Opin Cell Biol 18(3): 261-266.
- Muchardt, C. and M. Yaniv (1999). "The mammalian SWI/SNF complex and the control of cell growth." Semin Cell Dev Biol 10(2): 189-195.
- Murphy, S. K., Z. Huang, et al. (2006). "Frequent IGF2/H19 domain epigenetic alterations and elevated IGF2 expression in epithelial ovarian cancer." Mol Cancer Res 4(4): 283-292.
- Ness, R. B. and C. Cottreau (1999). "Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer." J Natl Cancer Inst 91(17): 1459-1467.
- Nomura, H., K. Uzawa, et al. (2008). "Clinical significance of gelsolin-like actin-capping protein expression in oral carcinogenesis: an immunohistochemical study of premalignant and malignant lesions of the oral cavity." BMC Cancer 8: 39.
- O'Dell, S. D. and I. N. Day (1998). "Insulin-like growth factor II (IGF-II)." Int J Biochem Cell Biol 30(7): 767-771.

- Olave, I. A., S. L. Reck-Peterson, et al. (2002). "Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling." Annu Rev Biochem 71: 755-781.
- Olson, M. F. and R. Marais (2000). "Ras protein signalling." Semin Immunol 12(1): 63-73.
- Onoda, K. and H. L. Yin (1993). "gCap39 is phosphorylated. Stimulation by okadaic acid and preferential association with nuclei." J Biol Chem 268(6): 4106-4112.
- Onoda, K., F. X. Yu, et al. (1993). "gCap39 is a nuclear and cytoplasmic protein." Cell Motil Cytoskeleton 26(3): 227-238.
- Overbeck, A. F., T. R. Brtva, et al. (1995). "Guanine nucleotide exchange factors: activators of Ras superfamily proteins." Mol Reprod Dev 42(4): 468-476.
- Paddison, P. J. and G. J. Hannon (2002). "RNA interference: the new somatic cell genetics?" Cancer Cell 2(1): 17-23.
- Pak, C. W., K. C. Flynn, et al. (2008). "Actin-binding proteins take the reins in growth cones." Nat Rev Neurosci 9(2): 136-147.
- Partheen, K., K. Levan, et al. (2008). "Four potential biomarkers as prognostic factors in stage III serous ovarian adenocarcinomas." Int J Cancer 123(9): 2130-2137.
- Partheen, K., K. Levan, et al. (2009). "External validation suggests Integrin beta 3 as prognostic biomarker in serous ovarian adenocarcinomas." BMC Cancer 9: 336.
- Percipalle, P., N. Fomproix, et al. (2006). "The chromatin remodelling complex WSTF-SNF2h interacts with nuclear myosin 1 and has a role in RNA polymerase I transcription." EMBO Rep 7(5): 525-530.
- Pere, H., J. Tapper, et al. (1998). "Genomic alterations in fallopian tube carcinoma: comparison to serous uterine and ovarian carcinomas reveals similarity suggesting likeness in molecular pathogenesis." Cancer Res 58(19): 4274-4276.
- Peters, L. L., K. M. John, et al. (1995). "Ank3 (epithelial ankyrin), a widely distributed new member of the ankyrin gene family and the major ankyrin in kidney, is expressed in

alternatively spliced forms, including forms that lack the repeat domain." J Cell Biol 130 (2): 313-330.

Pollard, T. D. and J. A. Cooper (1986). "Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions." Annu Rev Biochem 55: 987-1035.

Predanic, M., N. Vlahos, et al. (1996). "Color and pulsed Doppler sonography, gray-scale imaging, and serum CA 125 in the assessment of adnexal disease." Obstet Gynecol 88 (2): 283-288.

Prendergast, G. C. and E. B. Ziff (1991). "Mbh 1: a novel gelsolin/severin-related protein which binds actin in vitro and exhibits nuclear localization in vivo." EMBO J 10(4): 757-766.

Przybycin, C. G., R. J. Kurman, et al. (2010). "Are all pelvic (nonuterine) serous carcinomas of tubal origin?" Am J Surg Pathol 34(10): 1407-1416.

Quilliam, L. A., S. Y. Huff, et al. (1994). "Membrane-targeting potentiates guanine nucleotide exchange factor CDC25 and SOS1 activation of Ras transforming activity." Proc Natl Acad Sci U S A 91(18): 8512-8516.

Renz, M., B. Betz, et al. (2008). "Invasive breast cancer cells exhibit increased mobility of the actin-binding protein CapG." Int J Cancer 122(7): 1476-1482.

Salvador, S., B. Gilks, et al. (2009). "The fallopian tube: primary site of most pelvic high-grade serous carcinomas." Int J Gynecol Cancer 19(1): 58-64.

Sayer, R. A., J. M. Lancaster, et al. (2005). "High insulin-like growth factor-2 (IGF-2) gene expression is an independent predictor of poor survival for patients with advanced stage serous epithelial ovarian cancer." Gynecol Oncol 96(2): 355-361.

Scaltriti, M. and J. Baselga (2006). "The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy." Clin Cancer Res 12(18): 5268-5272.

Schmalhofer, O., S. Brabletz, et al. (2009). "E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer." Cancer Metastasis Rev 28(1-2): 151-166.

Seier, N. (2009). "Analyse der Modifikationen von CapG und ihre Bedeutung für die Metastasierung des Mammakarzinoms." Dissertation.

Shao, F., R. Zhang, et al. (2011). "Overexpression of gelsolin-like actin-capping protein is associated with progression of lung adenocarcinoma." Tohoku J Exp Med 225(2): 95-101.

Singer, G., R. Oldt, 3rd, et al. (2003). "Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma." J Natl Cancer Inst 95(6): 484-486.

Skare, P., J. P. Kreivi, et al. (2003). "Profilin I colocalizes with speckles and Cajal bodies: a possible role in pre-mRNA splicing." Exp Cell Res 286(1): 12-21.

Southwick, F. S. and M. J. DiNubile (1986). "Rabbit alveolar macrophages contain a Ca²⁺-sensitive, 41,000-dalton protein which reversibly blocks the "barbed" ends of actin filaments but does not sever them." J Biol Chem 261(30): 14191-14195.

Srinivasan, R., E. Benton, et al. (1999). "Expression of the c-erbB-3/HER-3 and c-erbB-4/HER-4 growth factor receptors and their ligands, neuregulin-1 alpha, neuregulin-1 beta, and betacellulin, in normal endometrium and endometrial cancer." Clin Cancer Res 5(10): 2877-2883.

Strober, B. E., J. L. Dunaief, et al. (1996). "Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins." Mol Cell Biol 16(4): 1576-1583.

Thompson, C. C., F. J. Ashcroft, et al. (2007). "Pancreatic cancer cells overexpress gelsolin family-capping proteins, which contribute to their cell motility." Gut 56(1): 95-106.

Ting, H. J., S. Yeh, et al. (2002). "Supervillin associates with androgen receptor and modulates its transcriptional activity." Proc Natl Acad Sci U S A 99(2): 661-666.

Trimbos, J. B., M. Parmar, et al. (2003). "International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1 and Adjuvant ChemoTherapy In Ovarian Neoplasm trial: two parallel randomized phase III trials of adjuvant chemotherapy in patients with early-stage ovarian carcinoma." J Natl Cancer Inst 95(2): 105-112.

- Valster, A. H., L. Vidali, et al. (2003). "Nuclear localization of profilin during the cell cycle in *Tradescantia virginiana* stamen hair cells." Protoplasma 222(1-2): 85-95.
- Van den Abbeele, A., V. De Corte, et al. (2007). "Downregulation of gelsolin family proteins counteracts cancer cell invasion in vitro." Cancer Lett 255(1): 57-70.
- Van Impe, K., V. De Corte, et al. (2003). "The Nucleo-cytoplasmic actin-binding protein CapG lacks a nuclear export sequence present in structurally related proteins." J Biol Chem 278(20): 17945-17952.
- Vandesompele, J., K. De Preter, et al. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biol 3(7): RESEARCH0034.
- Whittemore, A. S., R. Harris, et al. (1992). "Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. IV. The pathogenesis of epithelial ovarian cancer. Collaborative Ovarian Cancer Group." Am J Epidemiol 136(10): 1212-1220.
- Witke, W., W. Li, et al. (2001). "Comparisons of CapG and gelsolin-null macrophages: demonstration of a unique role for CapG in receptor-mediated ruffling, phagocytosis, and vesicle rocketing." J Cell Biol 154(4): 775-784.
- Yap, T. A., C. P. Carden, et al. (2009). "Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer." Nat Rev Cancer 9(3): 167-181.
- Ye, J., J. Zhao, et al. (2008). "Nuclear myosin I acts in concert with polymeric actin to drive RNA polymerase I transcription." Genes Dev 22(3): 322-330.
- Yee, D. (1994). "The insulin-like growth factor system as a target in breast cancer." Breast Cancer Res Treat 32(1): 85-95.
- Yee, D., J. Sharma, et al. (1994). "Prognostic significance of insulin-like growth factor-binding protein expression in axillary lymph node-negative breast cancer." J Natl Cancer Inst 86(23): 1785-1789.

Yu, F. X., P. A. Johnston, et al. (1990). "gCap39, a calcium ion- and polyphosphoinositide-regulated actin capping protein." Science 250(4986): 1413-1415.

Yu, F. X., D. M. Zhou, et al. (1991). "Chimeric and truncated gCap39 elucidate the requirements for actin filament severing and end capping by the gelsolin family of proteins." J Biol Chem 266(29): 19269-19275.

Zheng, B., M. Han, et al. (2009). "Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression." FEBS J 276(10): 2669-2685.

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Auswertung der Chip-Daten und Auswahl von sechs Genen
Tab. 2.1	Reaktionsansatz cDNA-Synthese
Tab. 2.2	Primer für die β -Aktin PCR
Tab. 2.3	β -Aktin-PCR, Ansatz und Reaktionsbedingungen
Tab. 2.4	Ansatz HRM Analyse
Tab. 2.5	Phasen und Zyklen der HRMA
Tab. 2.6	siRNA-Sequenzen
Tab. 2.7	Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE
Tab. 2.8	Erst- und Zweitantikörper für die Immunodetektion
Tab. 2.9	Ablauf der Isoelektrischen Fokussierung
Tab. 2.10	Erst- und Zweitantikörper für die Immunzytochemie
Tab. 3.1	Expressionsdaten von CapG-mRNA mit Real-time PCR
Tab. 3.2	Real-time PCR; Validierung der Western Blot-Analyse
Tab. 3.3	Genotyp-Frequenzen für den SNP rs6886
Tab. 3.4	Ergebnisse der Microchip-Analyse und deren Validierung mittels quantitativer Real-time PCR
Tab 3.5	Zusammenfassung der Expressionsänderung
Tab 3.6	Vierfeldertafel der mRNA Expressionsdaten

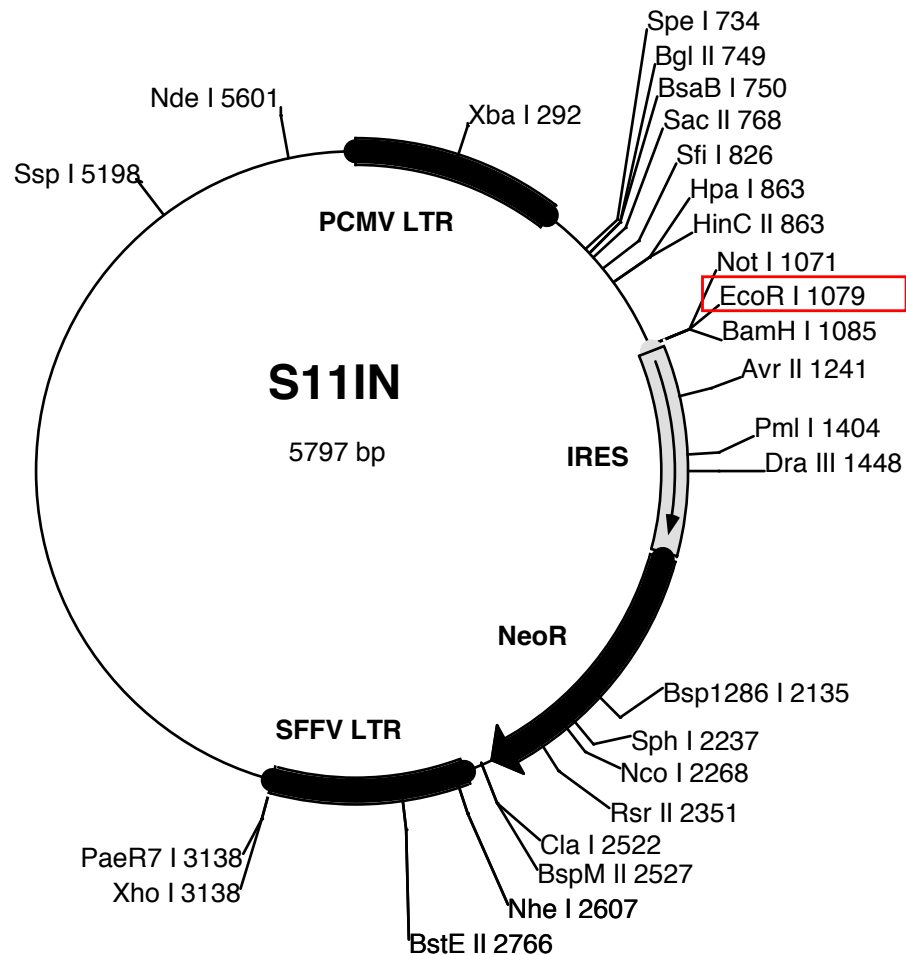
8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Modell zur Entstehung des Ovarialkarzinoms
Abb. 1.2	Aktinfilament- „Treadmilling“
Abb. 1.3	Funktionen der ABP
Abb. 1.4	Microarray
Abb. 2.1	Schmelzkurvenanalyse
Abb. 2.2	Schema einer Schmelzkurve
Abb. 2.3	Elektronenmikroskopischer Scan zweier Fibrosarkomzellen
Abb. 2.4	Schemazeichnung des Invasionsassay Matrigel
Abb. 2.5	Scratch Assay Schema
Abb. 3.1	Relative Expression von CapG in Ovar-Tumorgewebe
Abb. 3.2	Relative Expression von CapG in den Zelllinien Hey und SK-OV-3
Abb. 3.3	Invasionsassay Zelllinie SK-OV-3
Abb. 3.4	Invasionsassay Zelllinie Hey
Abb. 3.5	Western Blot
Abb. 3.6	Scratch Assay Zelllinie Hey
Abb. 3.7	Scratch Assay Zelllinie SK-OV-3
Abb. 3.8	Ergebnis des Scratch Assays
Abb. 3.9	Invasionsassay SK-OV-3
Abb. 3.10	Invasivitätsindex
Abb. 3.11	Western Blot Analyse nach subzellulärer Fraktionierung
Abb. 3.12	Immunzytochemische Anfärbung von CapG in nativen Hey-Zellen
Abb. 3.13	Immunzytochemie Hey S11-CapG-R-IN
Abb. 3.14	2D-Gelelektrophorese von CapG-Gesamtprotein
Abb. 3.15	Etablierung des SNP rs6886
Abb. 3.16	Diagramme der Genotyp-Verteilung beim Ovarial- und Tuba-Ca
Abb. 3.17	HRM-Schmelzkurven von 12 DNA-Tumorproben aus der Tuba uterina
Abb. 3.18	Verdünnungsreihe des IGF2-Primers
Abb. 3.19	Real-time PCR: Expressionsdaten der sechs Target-Gene
Abb. 3.20	Real-time PCR: Gegenüberstellung von SK-OV-3 nativ und nach siRNA-Behandlung sowie Hey vor und nach Transfektion mit dem CapG-Plasmid

-
- Abb. 3.21a** Real-time PCR Daten von CapG und IGF2
- Abb. 3.21b** Real-time PCR Daten von CapG im Vergleich mit Ank3
- Abb. 3.22** Expression der Kandidatengene nach 26-stündiger IGF-Stimulation
- Abb. 4.1** Translokation von STIC Zellen aus den Fimbrien der Tuba uterina ins Ovar
- Abb. 4.2** Humaner BAF-Komplex im Zellkern
- Abb. 4.3** Beteiligung von Aktin an der Bildung von Pre-mRNA im Zusammenspiel mit RNA-Polymerase II

9. Anhang

9.1. Plasmidkarte



Retroviraler Expressionsvektor S11IN; die CapG-Sequenz wurde über die EcoRI-Schnittstelle in das Plasmid kloniert und dieses anschließend verwendet für die stabile Transfektion von Zellen der ovariellen Zelllinie Hey. Konstruiert wurde dieser Vektor von Kerstin Goettsche und freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. H. Hanenberg (Klinik für Kinder-Onkologie, Hämatologie und Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

9.2. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass diese Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 17.06.2014

Johanna Glaser

9.3. Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. D. Niederacher bedanken für die Bereitstellung des Themas, die konstruktiven Gespräche und die intensive und freundliche Betreuung sowie bei Herrn Prof. Dr. med. M. Fleisch für die sehr gute wissenschaftliche Anleitung und die wertvolle Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Darüber hinaus gilt mein Dank für Austausch und fachliche Hilfestellung dem gesamten Laborteam der Frauenklinik, aber ganz besonders Frau Dr. N. Seier, Ellen Honisch und Martin Neumann. Herrn Prof. H. Hanenberg und Frau Dr. rer. nat. C. Wiek sowie meiner Kollegin C. Schleithoff danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Abschließend darf ich glücklicherweise feststellen: Familie und Freund mögen mich noch. Für die tausend Augen, die ihr ausdrücken musstet und für die fachliche und vor allem moralische Unterstützung bin ich sehr dankbar!