

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Rainer Haas

Funktionelle Untersuchung des "pituitary tumor transforming gene" PTTG1 in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinien mittels RNA-Interferenz

> Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Guillermo García-Pardillos

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf

> gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Ralf Kronenwett Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Fritz Boege Dedicado a mi familia

Abki	irzungsv	erzeichnis	8
1.	EINLEI	TUNG	10
1.1		Das Lungenkarzinom	10
	1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	10
	1.1.2	Histologische Einteilung	11
	1.1.3	Molekulare Pathogenese des LC	12
	1.1.4	Therapie und Prognose	13
1.2		Das "pituitary tumor transforming gene" PTTG1	14
	1.2.1	Biochemische Charakterisierung des PTTG1	14
	1.2.2	Physiologische Funktionen des PTTG1	15
	1.2.3	Rolle als Onkogen	16
	1.2.4	Das PTTG1 und das LC	17
1.3	I	Die RNA-Interferenz	18
1.4	2	Zielsetzung dieser Arbeit	19
2.	MATER	RIAL UND METHODEN	21
2 . 2.1	Матег	RIAL UND METHODEN	21 21
2 . 2.1	Матег 2.1.1	RIAL UND METHODEN	21 21 21
2 . 2.1	MATEF 2.1.1 2.1.2	RIAL UND METHODEN	21 21 21 24
 2.1 2.2 	MATEF 2.1.1 2.1.2	RIAL UND METHODEN	21 21 21 24 24
 2.1 2.2 	MATEF 2.1.1 2.1.2 2.2.1	RIAL UND METHODEN	21 21 21 24 24 24
2. 2.1 2.2	MATER 2.1.1 2.1.2 2.2.1 2.2.2	RIAL UND METHODEN. Zellen. Zelllinien und Nährmedien. Zellkulturpflege. siRNAs, Kontroll-siRNAs und Plasmid. PTTG1-siRNAs. Kontroll-siRNAs.	 21 21 21 24 24 24 24 25
 2.1 2.2 	MATER 2.1.1 2.1.2 2.2.1 2.2.2 2.2.3	RIAL UND METHODEN	 21 21 24 24 24 25 27
 2.1 2.2 2.3 	MATER 2.1.1 2.1.2 2.2.1 2.2.2 2.2.3	Zellen Zelllinien und Nährmedien Zellkulturpflege. siRNAs, Kontroll-siRNAs und Plasmid PTTG1-siRNAs Kontroll-siRNAs GFP-Plasmid	 21 21 24 24 24 25 27 28
 2.1 2.2 2.3 	MATEF 2.1.1 2.1.2 2.2.1 2.2.2 2.2.3	Zellen Zelllinien und Nährmedien Zellkulturpflege. siRNAs, Kontroll-siRNAs und Plasmid PTTG1-siRNAs Kontroll-siRNAs GFP-Plasmid Transfektion Nukleofektion	 21 21 24 24 24 25 27 28 28

2.4		Trypanblau-Exklusionsmethode	29
2.5		Durchflusszytometrie	30
2.6		"Clonogenic Assay"	31
2.7		RNA-Extraktion, Konzentrationsmessung und Qualitätskontrolle	32
	2.7.1	RNA-Extraktion	32
	2.7.2	RNA-Konzentrationsmessung	33
	2.7.3	RNA-Qualitätskontrolle	33
2.8		Quantitative "real time" RT-PCR für PTTG1-mRNA	35
	2.8.1	cDNA-Synthese	35
	2.8.2	Quantitative "real time" RT-PCR	35
2.9	(Genexpressionsanalyse mit GeneChips	38
	2.9.1	Aufreinigung der doppelsträngigen cDNA	39
	2.9.2	Synthese und Markierung der cRNA	39
	2.9.3	Aufreinigung und Fragmentierung der cRNA	39
	2.9.4	Hybridisierung der cRNA und Scannen der Microarrays	40
	2.9.5	Ermittlung der differenziell exprimierten Gene	41
2.10		Western-Blot-Analyse	42
	2.10.1	Proteinextraktion	42
	2.10.2	Proteinbestimmung	42
	2.10.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
	2.10.4	Blotting	43
	2.10.5	Antikörper-Nachweisreaktion und Entwicklung mit ECL-Detection-	
		System	44
2.11		Statistische Auswertung	46
3.	Ergee	3NISSE	46
3.1		Evaluierung der Nukleofektion	46

	3.1.1	Untersuchung der Nukleofektionstoxizität für die Zelllinie H1299	46
	3.1.2	Untersuchung der Nukleofektionseffizienz	50
3.2		Evaluierung der Lipofektion	52
	3.2.1	Untersuchung der Lipofektionstoxizität für die NSCLC-Zelllinien	
		H1299, H23 und H157	52
	3.2.2	Untersuchung der Lipofektionseffizienz	55
3.3		Effekt der PTTG1-siRNA-Transfektion auf die PTTG1-mRNA-	
		Expression	58
	3.3.1	RNA-Qualitätskontrolle	58
	3.3.2	Quantifizierung der PTTG1-mRNA-Hemmung in den NSCLC-	
		Zelllinien	59
3.4		Effekt der PTTG1-siRNA-Transfektion auf die Protein-Expression	66
3.5		Transkriptionelle Effekte in der Zelllinie H23 durch PTTG1-	
		Herunterregulation	68
3.6		Funktionelle Effekte der PTTG1-Herunterregulation auf die	
		Zellproliferation	75
	3.6.1	Effekte auf die Zellzahl 24, 48 und 72 h nach Lipofektion	75
	3.6.2	"Clonogenic Assay"	78
4.	Disk	USSION	80
4.1		Zur Transfektion	81
4.2		Zu den transkriptionellen Effekten der PTTG1-Herunterregulation in	83
		der Zelllinie H23	
	4.2.1	Zellzyklus	85
	4.2.2	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg	86
	4.2.3	Apoptose	87
	4.2.4	Wachstumsfaktoren	88
	4.2.5	WNT-Kalzium	89
	4.2.6	Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrix	90

4.3	Zur Lungenadenokarzinom-Zelllinie H23	91
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick	92
5.	ZUSAMMENFASSUNG	94
Literat	urverzeichnis	95
Eigene	e Publikationen	106
Curric	ulum vitae	107
Danks	agung	108

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
APC	"anaphase promoting complex"
ATCC	"American Tissue Culture Collection"
BAX	"BCL2-associated X protein"
BCL-2	"B cell lymphoma-2"
bFGF	"basic fibroblastic growth factor"
BLAST	"Basic Local Alignment Search Tool"
Вр	Basenpaare
BSA	"bovine serum albumin"
bzw.	beziehungsweise
CDK	"cyclin dependent kinase"
cDNA	komplementäre DNA
C-MYC	"C-myelocytomatosis viral oncogene homolog"
СТ	"Threshold Cycle"
DNA	"desoxyribonucleic acid"
dsRNA	Doppelstrang-RNA
ECOG	"Eastern Cooperative Oncology Group"
EGF	"epithelial growth factor"
EGFR	"epithelial growth factor receptor"
FACS	"Fluorescence Activated Cell Sorting"
FCS	Fötales Kälberserum
FDR	"false discovery rate"
FHIT	"fragile histidine triad gene"
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
FSC	"Forward Scatter"
GADPH	"glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase"
GFP	"green fluorescent protein"
hMLH1	"human mutL homolog 1"
IGF	"insulin-like growth factor"
IVT	"in vitro transcription"
K-RAS	"v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog"
LC	Lungenkarzinom

LOH	"loss of heterozygosity"
mRNA	"messenger"-RNA
NCBI	"National Center for Biotechnology Information"
NSCLC	"Non-small cell lung cancer" (Nicht-kleinzelliges
	Lungenkarzinom)
OMIM	"Online Mendelian Inheritance in Man"
PBS	"Fetal bovine serum"
PCR	"polymerase chain reaction"
PTTG	"pituitary tumor transforming gene"
PVDF	Polyvinyl-Difluorid
RASSF1A	"Ras association (RaIGDS/AF-6) domain family 1A"
RB	Retinoblastom
RNA	"ribonucleic acid"
RNAi	RNA-vermittelte Interferenz
ROBO1	"roundabout, axon guidance receptor, homolog 1"
RISC	"RNA-induced silencing complex"
RT-PCR	quantitative "real-time" RT-PCR
RT	reverse Transkription
SAM	"Significance Analysis of Microarrays"
SCLC	"small cell lung cancer" (kleinzelliges Lungenkarzinom)
SDS	"Scientific Data System"
siRNA	"small interfering"-RNA
sog.	sogenannte
SSC	"Side Scatter"
TGF	"transforming growth factor"
TSG	"tumor suppressor gene"
VEGF	"vascular endothelial growth factor"
VSN	"Variance Stabilization Normalization"
WASF	"Wiskott Aldrich Syndrom Protein Family"
WHO	"World Health Organisation"
WNT	"Wingless-Int"
z.B.	Zum Beispiel

1. EINLEITUNG

1.1 Das Lungenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Lungenkarzinom (LC) ist in Europa und den USA die häufigste bösartige Tumorerkrankung. In Deutschland ist das LC die häufigste tumorassoziierte Todesursache bei Männern und mit steigender Tendenz die dritthäufigste bei der Frau. 25% aller Karzinome sind LC mit einer weltweit zunehmenden Inzidenz von 60/100.000 Personen pro Jahr und einem Häufigkeitsgipfel im 60. Lebensjahr. Außer beim Subtyp Adenokarzinom sind Männer dreifach häufiger betroffen als Frauen¹⁻³.

Als Ursache werden exogene und endogene Faktoren unterschieden, Rauchen stellt den wichtigsten exogenen Faktor dar. 75 bis 90% aller Bronchialkarzinomfälle bei Männern und 30 bis 60% bei Frauen sind dem Rauchen zuzuschreiben. Der Anteil der Raucher, die einen bösartigen Lungentumor entwickeln, beträgt rund 20%⁴⁻⁶. Dies geschieht zum Teil über chronischinflammatorische Prozesse und deren Proliferationsreize, zum Teil über inhalierte Mutagene und durch sie bedingte, genetische Veränderungen der Bronchialepithelzellen. Rauchen fördert vor allem das Auftreten von kleinzelligen-(SCLC) und Plattenepithelkarzinomen. Andere Beispiele für exogene Karzinogene sind Arsen, Asbest, Benzopyren, Nickel, Radon und Uranstaub^{2;4}.

Auch die Ernährung scheint einen Einfluss auf die Entstehung eines Karzinoms zu haben. So halbiert sich bei gemüsereicher Kost die statistische Wahrscheinlichkeit an einem LC zu erkranken, während besonders fettreiche Nahrung sie verdoppelt⁷⁻⁹.

Einige endogene, genetische Dispositionen können bei der Entstehung von LC von Bedeutung sein. Zu nennen sind eine erhöhte Cytochrom P-450 Aktivität mit vermehrter Bildung von Kanzerogenen, eine verringerte Glutathiontransferase- oder N-Acetyltransferase-Aktivität mit vermindertem Abbau von Kanzerogenen sowie eine verringerte Aktivität der DNA-Reparaturenzyme wie das hMLH1. Insgesamt jedoch

kommt den endogenen Faktoren gegenüber den exogenen Einflüssen eine geringere Bedeutung zu. Während Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern ein 14-fach erhöhtes Risiko für LC aufweisen ist dieses nur 2,5-fach höher bei Menschen mit familiärer Vorgeschichte eines LC^{2;10-14}.

1.1.2 Histologische Einteilung

Die Einteilung der bösartigen epithelialen Tumoren der Lunge und Bronchien folgt der 3. WHO-Klassifikation von 1999, wobei diese zwei Gruppen zugeordnet werden können, dem kleinzelligen (SCLC) und dem nicht kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC). Das NSCLC teilt sich in drei Subtypen ein, dem Plattenepithel-, Adenound großzelligen Karzinom. Die Tabelle 1 zeigt die histologische Klassifikation nach der WHO mit der Frequenz jedes Subtyps^{15;16}. Die Relevanz der histologischen Zuordnung liegt in der prognostischen und therapeutischen Bedeutung.

1. Nichtkleinzellige Bronchialkarzinome	
a) Plattenepithelkarzinom	ca. 33,4 %
Subtyp: spindelzelliges Karzinom	
b) Adenokarzinom	ca. 35,8 %
- azinär	
- papillär	
- bronchioloalveolär	
- solide mit Schleimbildung	
c) Großzelliges Karzinom	ca. 10,5 %
Subtypen:	
- Riesenzelltumor	
- Klarzelltumor	
d) Seltene Subentitäten	
- adenosquamöses Karzinom	
- adenoid-zystisches Karzinom	
- mukoepidermoides Karzinom	
- Mischtumor	
2. Kleinzellige Bronchialkarzinome	
a) Oat-cell- oder lymphozytenähnlicher Typ	ca. 20,3 %
b) Intermediärer Typ	
c) Kombinierter Typ (mit Anteilen eines Plattenepithel-, Adeno- oder großzelligen Karzinoms)	

 Tabelle 1: Histologische Einteilung des LC nach der 3. WHO-Fassung, 1999

1.1.3 Molekulare Pathogenese des LC

In der Genese eines LC spielen zehn bis zwanzig molekulargenetische Ereignisse eine wichtige Rolle. Dabei handelt es sich vor allem um Mutationen der Gene, die an der Kontrolle des Zellzyklus und der Zellproliferation beteiligt sind. Diese werden in die Klassen der Tumorsuppressor- und Protoonkogene sowie der Wachstumsfaktoren eingeteilt. Art und Reihenfolge dieser Mutationen sind jedoch von Fall zu Fall selbst bei gleichem histologischem Phänotyp verschieden, weshalb eine simple, lineare Pathogenese nicht angenommen werden kann^{13;14;17-19}.

Die Mutationen sind meist durch exogen zugeführte, DNA schädigende Substanzen bedingt, so genannte Mutagene. Für die Erkrankungswahrscheinlichkeit ist die Menge an Mutagenen bedeutsam, denen die Lunge insgesamt ausgesetzt war. Wenn die Kapazität der DNA-Reparaturenzyme überschritten wird, können DNA-Schäden nicht mehr effektiv verhindert werden und manifestieren sich als Mutationen. Nikotin selbst wirkt indirekt kanzerogen, indem es die lokale Wirkung von endogenen Opiaten an den Opioidrezeptoren der Lunge antagonisiert, die dort proliferationshemmende und proapoptotische Eigenschaften entfalten^{10;19}. Für das LC wurden eine Reihe beim SCLC und NSCLC unterschiedlich typischer Mutationen beschrieben, die zu funktionellen Veränderungen der Tumorzellen führen.

Die Krebszellen verfügen über autonome Zellproliferationssignale und Selbstversorgungsmechanismen, die auf autokrinen und parakrinen Faktoren beruhen. So exprimieren Lungenkrebszellen Wachstumsfaktoren wie EGF, TGFα oder IGF.

Darüber hinaus werden Protoonkogene wie K-ras und C-myc aktiviert, welche autonomen Zellwachstum führen. Beim SCLC werden zu einem einige Protoonkogene wie zum Beispiel das BCL2 überexprimiert, andere wie das proapoptotische BAX herrunterreguliert, SO dass die Tumorzellen den Apoptosemechanismen entgehen.

Die so genannten "tumour suppressor genes" (TSGs) werden durch chromosomalen Verlust eines Allels ("loss of heterozygosity", LOH) inaktiviert. Die chromosomalen Arme mit den häufigsten LOH sind 3p, 5q, 9p, 13q und 17p²⁰⁻²³. Hier befinden sich wichtige Gene wie beispielsweise das FHIT. Unsere Arbeitsgruppe konnte die Expression von FHIT und der Tyrosinkinase c-kit mit einer besseren Prognose beim SCLC assoziieren^{24;25}. Weitere TSG sind das RASSF1A und das

ROBO1, die hypermethyliert und inaktiviert werden, und das p53, welches in 75% der SCLC und 50% der NSCLC mutiert und inaktiviert ist.

Besonders wichtig für die Zellzykluskontrolle ist der p16-cyclinD1-CDK4-RB-"Pathway". Während das TSG Retinoblastom (RB) häufiger beim SCLC inaktiviert ist, werden die Komponenten p16, cyclin D1 und CDK4 eher beim NSCLC betroffen. Der Verlust der Zellzykluskontrolle führt zu einer vermehrten Zellproliferation.

Die Krebszellen besitzen die Fähigkeit, in das Gewebe einzuwandern und Metastasen zu bilden. Hier spielen Gene der Fokaladhäsion und der extrazellulären Matrix eine Hauptrolle. Semaphorine, Integrine und Laminine zählen zu den Molekülen, die für die Fernmetastasierung eines LC verantwortlich sind.

Zwei weitere Aspekte in der molekularen Pathogenese des LC sind die Expression der Telomerase, wodurch die Zellalterung gehemmt wird, und die Neoangiogenese, welche heutzutage ein primäres therapeutisches Ziel beim LC darstellt^{20;21}.

1.1.4 Therapie und Prognose

Die Therapie des LC ist meist palliativ und nur das operative Verfahren stellt eine kurative Option dar. Fast 2/3 aller Fälle sind jedoch bereits bei der Diagnose inoperabel, insbesondere das SCLC aufgrund der frühen Fernmetastasierung. Nur 15% der Patienten haben einen lokalisierten Tumorbefall, mehr als 55% haben bereits Fernmetastasen bei Diagnosestellung.

Das SCLC spricht häufig gut auf eine Chemotherapie aus Platin und Etoposid oder auf eine Strahlentherapie an. Die Therapie des NSCLC besteht primär aus der Chirurgie bzw. ab Stadium III aus einer palliativen Radiochemotherapie. Hier werden verschiedene Chemotherapeutika eingesetzt, etwa die Kombination aus Platin und Paclitaxel.

In den letzten Jahren haben neue Therapieansätze wie die sog. "targeted therapy" und die antivaskuläre Therapie immer mehr an Bedeutung gewonnen. Diese neuen Wirkmechanismen treffen genauer ins Ziel als die Chemotherapeutika. Der Nachweis einer Überexpression von Rezeptoren für den epithelialen Wachstumsfaktor (EGFR) in den NSCLC hat zur Entwicklung von neuen kleinen chemisch-synthetischen Molekülen geführt, die diese Rezeptoren gezielt blockieren.

Eines dieser Moleküle ist das Tarceva® (Erlotinib), welches die intrazelluläre Tyrosinkinase-Aktivität von EGFR hochspezifisch inhibiert und das mediane Überleben von Patienten mit NSCLC um ca. zwei Monate verlängert^{26;27}.

Ein anderer neuer Therapieansatz ist die Blockade der Gefäßneubildung mit monoklonalen Antikörpern, um die Versorgung der Tumorzellen zu unterbinden. Avastin® (Bevacizumab) ist ein solcher Antikörper, der in Kombination mit der klassischen Chemotherapie ein besseres Ansprechen als die Chemotherapie und ein medianes Überleben von ca. zwei zusätzlichen Monaten alleine gezeigt hat²⁸.

Trotz verschiedener Therapieansätze beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate aller LC ca. 15%. Besonders ungünstig ist die Prognose des SCLC aufgrund der frühen Fernmetastasierung. Hier beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate nur 5%. Selbst bei prognostisch günstigen Formen wie dem lokalisierten Befall eines NSCLC liegt die 5-Jahres-Überlebensrate mit Therapie bei nur 50%. Diese hat sich jedoch in den letzten 30 Jahren verdoppelt. Die Prognose des LC hängt im Wesentlichen von einer frühen Diagnosestellung ab.

1.2 Das "pituitary tumor transforming gene", PTTG1

1.2.1 Biochemische Charakterisierung von PTTG1

1997 identifizierten Pei et al. ein neues Onkogen in Hypophysentumoren der Maus, welches eine wichtige Rolle für den malignen Phänotyp dieser Tumoren spielt und als "pituitary tumor transforming gene" bezeichnet wurde²⁹. Dominguez et al. fanden 1998 humane, dem Onkogen PTTG1 der Maus homologe cDNA, welche ein 23 kDa schweres, 202 Aminosäuren großes Protein kodiert. Das PTTG1-Gen des Menschen befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 5 (5q33) und hat 6 Exons. Das Protein ist reich an Prolin und besitzt funktionelle SH3-Bindungsstellen³⁰⁻³².

Mittels Northern-Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass PTTG1 physiologisch von Hoden, Thymus, Dickdarm, Dünndarm, Leber und Pankreas exprimiert wird, wobei die stärkste PTTG1-Expression in verschiedenen Krebszelllinien wie z.B. HL-60, HeLa, K-562 oder A549 gesehen wurde³³.

1999 entdeckten Prezant et al. ein verwandtes, auf Nukleotid- und Aminosäureebene hoch konserviertes Gen auf dem Chromosom 4p12, welches als PTTG2 bezeichnet wurde. Dieses Gen hat keine Introns und das Protein besitzt SH3-Bindungsstellen. Es wird von der normalen sowie tumoralen Hypophyse exprimiert. Die hohe PTTG-Proteinkonzentration in verschiedenen Krebszelllinien ist jedoch auf eine Überexpression von PTTG1 zurückzuführen³⁴.

Das PTTG3 ist ein drittes Gen der PTTG-Familie. Es liegt auf dem Chromosom 8 und wurde 2000 von Chen et al. identifiziert. Das PTTG2 ist zu 91% und das PTTG3 zu 89% identisch zum PTTG1 auf Aminosäureebene. Die Funktionen von PTTG2 und 3 sind bislang ungeklärt³⁵.

1.2.2 Physiologische Funktionen vom PTTG1

Die wichtigste Funktion hat das PTTG1-Protein im Zellzyklus, wo es als mitotischer "Checkpoint" funktioniert und für die gleiche Chromosomenzahl aller Zellen (Euploidie) sorgt. Aufgrund dieser Funktion wird das PTTG1 auch als "Securin" bezeichnet. Während der Metaphase bindet das PTTG1 an das Protein Separin und hemmt dessen Separation der paarigen Chromatiden. Am Ende dieser Phase wird das PTTG1 mit einem "anaphase promoting complex" (APC) verbunden und vom Proteasom lysiert³⁶⁻⁴⁰, so dass das Separin frei gesetzt wird und die Chromatiden zu den beiden Zellpolen wandern können. Wird das PTTG1 nicht abgebaut, so kommt es zu chromosomalen Aberrationen⁴¹⁻⁴³ und Tumorgenese⁴⁴.

Lokalisation und Konzentration des PTTG1-Proteins sind vom Zellzyklus abhängig und werden eng von einer Mitogen-aktivierten Proteinkinasekaskade reguliert. So findet man die höchste PTTG1-Konzentration im Nukleus am Ende des Zellzyklus (Anaphase)^{45;46}.

Weitere physiologische Funktionen des PTTG1 sind die testikuläre Spermatogenese und die normale Proliferation der pankreatischen Betazellen. Die "knock out" Mäuse für dieses Gen entwickeln Diabetes, Hoden- und Milzhypoplasie sowie eine gestörte Zellzyklusprogression^{33;47-50}.

1.2.3 Rolle als Onkogen

Eine PTTG1-Überexpression ist bei verschiedenen Krebsarten und Zelllinien dokumentiert. So findet man eine erhöhte PTTG1-Expression gegenüber Normalgewebe bei Tumoren der Hypophyse, der Schilddrüse, der Niere, des Gastrointestinaltrakts, der Brust sowie bei Leukämien und Lymphomen⁵¹⁻⁶⁰.

Die Transfektion von Wildtyp PTTG1 in der Fibroblastenzelllinie NIH3T3 der Maus führte in einem Experiment von Kakar et al. 1998 zu einer vermehrten Zellproliferation und –entartung in vitro sowie zur Tumorbildung in vivo nach Injektion dieser Zellen in Mäusen (Abb. 1). Dies bestätigte die Onkogenität des PTTG1. Ursächlich wurde eine genetische Instabilität mit daraus folgender Aneuploidie vermutet^{46;61}.



Abb. 1: Tumorformation (↑) nach Injektion von PTTG1-transfizierten NIH3T3-Zellen in Mäuse^{46;61}

Für das Wachstum und die Metastasierung eines Tumors spielt die Bildung neuer Gefäße, die Neoangiogenese, eine Hauptrolle. Diese wird vom "vascular endothelial growth factor" (VEGF) sowie vom "basic fibroblast growth factor" (bFGF) gefördert. Da die mit PTTG1-transfizierten NIH3T3-Zellen eine höhere Menge an bFGF als die nicht transfizierten produzieren³³, untersuchten Ishikawa et al. diese Zelllinie mit verschiedenen Methoden auf Angiogenese und konnten zeigen, dass

das PTTG1 einen proangiogenetischen Phänotyp sowohl in vitro als auch in vivo induziert. Obwohl die NIH3T3-Zellen keine erhöhte VEGF-Expression aufweisen, konnte der VEGF-Spiegel durch eine PTTG1-Induktion gesteigert werden. Die Angiogenese wird deshalb unter anderen vom PTTG1 gefördert⁶²⁻⁶⁵.

Weiterhin konnte durch immunhistochemische Untersuchungen verschiedener Tumore eine verstärkte PTTG1-Immunoreaktivität für Adenokarzinome der Mamma und der Lunge gezeigt werden⁵⁶. Ferner war eine starke PTTG1-Expression mit einer verstärkten Metastasierungsfähigkeit solider Tumore⁶⁶ sowie einer vermehrten lokalen Invasion verbunden^{53;62}.

Die Beziehung zwischen dem PTTG1 und dem proapoptotischen Gen p53 wurde ebenfalls untersucht. Das PTTG1 blockiert die Verbindung des p53-Proteins zur DNA, verhindert seine proapoptotische Aktivität und führt so zu einer Zellvermehrung⁶⁷. Übereinstimmend dazu zeigte die PTTG1-Hochregulation eine vermehrte Zellproliferation durch die Aktivierung des c-myc-Gens⁶⁸. Andere Studien sprechen dem PTTG1 neben der p53-abhängigen auch eine p53-unabhängige proapoptotische Aktivität zu, so dass die Funktion des PTTG1 und dessen Beziehung zum p53-Protein unklar bleibt.

1.2.4 Das PTTG1 und das LC

Erst 2003 bewiesen Honda et al. die Beteiligung des PTTG1-Onkogens in der Genese und Progression von NSCLC. Mittels quantitativer RT-PCR und immunhistochemischen Untersuchungen fanden sich höhere PTTG1-mRNA- und Protein-Konzentrationen in den Proben von Patienten mit NSCLC als im normalen Lungengewebe³⁶.

Die Rolle des PTTG1 scheint in den verschiedenen histologischen LC-Subtypen unterschiedlich zu sein. So konnte unsere Arbeitsgruppe mittels immunhistochemischen Färbungen eine PTTG1-Expression bei 64% der SCLC und 97,8% der NSCLC zeigen. Eine erhöhte PTTG1-Expression war bei Patienten mit SCLC mit einem längeren Überleben (379 im Vergleich zu 265 Tagen für Patienten mit negativer PTTG1-Expression) verbunden, jedoch mit einer verstärkten Tumoraggressivität sowie Fernmetastasierung und somit einem verkürzten Überleben (306 im Vergleich zu 463 Tagen) bei Patienten mit NSCLC assoziiert⁶⁹.

Mittels Genexpressionsanalysen konnte unsere Arbeitsgruppe außerdem eine vermehrte Expression einer Vielzahl von Genen aus den Bronchoskopiebiopsaten von Patienten mit Lungenkarzinom nachweisen (unpublizierte Daten). Die verschiedenen histologischen Subtypen zeigten unterschiedliche molekulare Phenotypen, die die biologischen Merkmale dieser Tumore wiedergeben. So waren zum Beispiel beim SCLC elf Neuronen-assozierte Gene hochreguliert, was für den neuroendokrinen Ursprung dieses Tumors spricht. Das PTTG1 war bei allen histologischen Subtypen überexprimiert. Mittels PCR konnte dann gezeigt werden, dass das Adenokarzinom die höchste PTTG1-mRNA-Konzentration aufwies.

1.3 Die RNA-Interferenz

1998 beschrieben Fire und Mello eine spezifische mRNA-Degradation mittels einer Doppelstrang-RNA (dsRNA), die sie als "RNA-vermittelte Interferenz" (RNAi) oder posttranskriptionelles "gene silencing" bezeichneten⁷⁰. Ihre Arbeit wurde 2006 mit dem Nobelpreis anerkannt. Die RNA-Interferenz dient der Zelle als Schutz vor viralen Angriffen und beruht auf einem RNAse III-ähnlichen Enzym, das als "Dicer" bezeichnet wird. Dieses Enzym, welches in allen multizellulären Organismen vorhanden ist, spaltet dsRNA in kurze, 21 bis 23 Nukleotide lange Stücke, den sog. "small interfering RNAs" (siRNA). Die siRNA wird dann von einem Endoribonukleasenhaltigen "RNA-induced silencing complex" (RISC) benutzt, um die mRNA komplementärer Sequenz zu verdauen (Abb. 2).

Die Einschleusung großer dsRNA (>50 bp) aktiviert in Säugetierzellen jedoch eine Interferon-Freisetzung, unspezifische mRNA-Degradation sowie einen Proteinsynthesearrest, was auch einen Teil der Virusabwehr bildet⁷⁰. Elbashir et al. zeigten 2001, dass die direkte Einschleusung von synthetischen, kurzkettigen siRNAs in Zellen eine solche Antwort vermeiden kann^{71;72}. Dieser Mechanismus der spezifischen mRNA-Degradation kann experimentell zur Herunterregulation und damit zur funktionellen Ausschaltung von bestimmten Genen verwendet werden.



Abb. 2: RNA-Interferenz

Die doppelsträngigen RNA-Ketten werden vom Enzym Dicer in kleine, 21 bis 23 Nukleotide lange siRNAs gespalten. Diese werden vom "RNAinduced silencing complex" RISC benutzt, um die mRNA komplementärer Sequenz zu verdauen.

Der siRNA-Transfer in die Zellen kann durch virale, chemische (Lipofektion) oder physikalische (Nukleofektion oder Elektroporation) Methoden erfolgen.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Fortschritte der letzten Jahre in der Behandlung des Lungenkarzinoms basieren auf der gezielten Blockade pathophysiologisch relevanter Proteine wie dem EGFR oder dem VEGF. Ein weiterer, viel versprechender Kandidat für eine zielgerichtete Therapie beim LC ist das PTTG1, welches beim NSCLC hochreguliert ist und für einen malignen Phänotyp mitverantwortlich ist. Ziel dieser Arbeit war daher die funktionelle Charakterisierung des PTTG1 in NSCLC. Dafür sollte die siRNA-Technologie verwendet werden, welche die funktionelle Ausschaltung eines Gens ermöglicht. Zunächst sollte für drei Lungenkarzinomzelllinien das beste Transfektionsverfahren gefunden werden. Hierfür wurden die Lipofektion und die Nukleofektion etabliert. Dabei wurden Fluoreszenzmarkierte siRNAs und GFP-exprimierende Plasmide als positive Kontrollen verwendet.

Die beste Methode sollte dann verwendet werden, um gegen das PTTG1 gerichtete, spezifische siRNAs zu transfizieren und das PTTG1-Gen herunterzuregulieren. Zur Identifizierung transkriptioneller Veränderungen nach der PTTG1siRNA-Transfektion und -Herunterregulation sollten Genexpressionsanalysen der transfizierten Zellen durchgeführt werden. Die Analysen identifizieren Signalwege und Gene, die durch das PTTG1 beeinflusst werden.

Schließlich sollten funktionelle Tests wie Proliferation und klonogenes Wachstum durchgeführt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellen

2.1.1 Zelllinien und Nährmedien

Insgesamt wurden drei histologisch unterschiedliche LC-Zelllinien-Subtypen untersucht: die nicht-kleinzellige Zelllinie H1299 aus einer Lymphknotenmetastase, die Adenokarzinom-Zelllinie H23 (Abb. 3) sowie die Plattenepithelkarzinom-Zelllinie H157, jeweils aus dem Lungengewebe. Alle drei wurden von der "American Tissue Culture Collection" (ATCC) erworben und sind adhärent und epithelial aussehend.



Abb. 3: Zelllinie H23 (Adenokarzinom der Lunge), ATCC[®]-Nummer CRL-5800

In Kollaboration mit dem Institut für Pathologie der Universität Düsseldorf wurde die Zelllinie H23 in Paraffin eingebettet und anschließend immunzytochemisch gefärbt. Hierbei zeigte sich eine Hämatoxillin-Eosin positive Karzinom-Zelllinie mit positiver Reaktion für Panzytokeratin und Zytokeratin (CK) 8 (Abb. 4), was für ein Adenokarzinom sprach. Weitere klassische Adenokarzinom-Färbungen wie das CK7, TTF-1, CEA und CA19-9 waren negativ. Ferner zeigte sich eine starke Positivität für den Proliferationsmarker Ki67 (Mib1).



Abb. 4: Immunhistochemische Charakterisierung der Lungenadenokarzinom-Zelllinie H23. H/E (Hämatoxillin-Eosin), Marker für Karzinome. CK (Panzytokeratin) und CK8 (Zytokeratin 8), Marker für Adenokarzinome. Ki67, Proliferationsmarker.

Anschließend wurde die Zelllinie zytogenetisch in Kollaboration mit dem Institut für Humangenetik der Universität Düsseldorf charakterisiert. Es konnte in allen 15 untersuchten Mitosen ein auffälliger Karyotyp aufgefunden werden. Es fand sich ein "near" tetraploider, komplex veränderter Chromosomensatz. Die aufgestellte Chromosomenformel stellte einen "composite" Karyotyp dar (Abb. 5). Ferner besitzen die H23 Zellen laut ATCC-Informationen eine Mutation des Codons 246 (ATC \rightarrow ATG, Isoleucin \rightarrow Methionin) des p53-Gens, sowie eine K-ras 12-Mutation. Sie exprimieren C-myc, L-myc, H-ras, Ki-ras und N-ras-RNA und besitzen eine heterogene mRNA-Expression von PDGFA und –B, TGF α und –ß sowie EGFR⁷³.



Abb. 5: Zytogenetische Charakterisierung der Lungenadenokarzinom-Zelllinie H23. "Near" tetraploider komplex veränderter Chromosomensatz: 90-94,X,del(X)(q22),-X/Y,-X/Y,der(1;3) (p10;q10), der(1;5)(p10;q10), add(1)(q11)x2,add(1)(p11),der(1;7)(q10;p10),der(1;13)(p10;p10), add(2)(q3?),+add(2)(q32), i(3)(q10),add(3)(p11),del(3)(p11),der(3;15)(q10;p10),add(4)(q21), del(4)(q31)x2,del(4)(p11),add(5)(p14), +der(5;6)(q10;p10),del(5)(p13q33)1-3x,der(5;13)(p10;q10), add(6)(q25), +del(6)(q13)x2, add(7)(q22),del(7) (q22),del(7)(p11)1-3x,+i(8)(q10),+del(8)(p11-12) 1-2x,del(9)(p13)x2,+der(?)t(?;9)(?;q12),del(10)(p11), del(10) (q24),add(10)(q26),-10,del(11)(p11), del(11)(q23)1-2x,+del(11)(q13)1-2x,del(12)(p11),del(12)(q24), add(12)(p13),del(12)(p22),add(13) (p11),add(14)(p11),-14,-14,add(15)(q2?),-15,-15,add(16)(q13), -16,del(17)(q25),-17,-17,-18,-18, add(19)(q13),+19,+22,+7-15mar[cp15]

Das Nährmedium für alle Zelllinien war RPMI 1640 mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 1% L-Glutamin 2mM sowie 1% Penicillin/Streptomycin (jeweils Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Für die Zellpassage wurden Trypsin 0,05% (Bio-Whittacker, Verviers, Belgien) und Zellkulturflaschen mit 25 oder 75 cm² Bodenoberfläche für adhärente Zellen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) verwendet.

2.1.2 Zellkulturpflege

Alle Zelllinien wurden nach den ATCC-Richtlinien bei 37°C mit 5% CO₂ der Luft im Brutschrank bei gleichen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einem "Laminar-Air-Flow" Arbeitsplatz etwa drei bis viermal in der Woche nach folgendem Verfahren passagiert: nach Abpipettieren des alten Mediums erfolgte das Lösen der adhärenten Zellen durch fünfminütige Inkubation bei 37°C mit 2 ml 0,05% Trypsin. Das Trypsin wurde anschließend durch vorsichtige Zugabe von 4 ml altem Medium inaktiviert. Die Zellen wurden in zwei Zellkulturflaschen á 3 ml geteilt und mit 17 ml neuem Medium resuspendiert. Bei Farbumschlag des Indikators im Medium fand zusätzlich ein Austausch von 10 ml Medium in den Zellkulturflaschen statt.

2.2 siRNAs, Kontroll-siRNAs und Plasmid

2.2.1 PTTG1-siRNAs

Ambion[®] stellt drei synthetische, spezifische siRNAs für zwei der sechs Exons des PTTG1-Onkogens her: die gegen das 6. Exon gerichtete siRNA mit der ID-Nr. #42068 und die gegen das 3. Exon siRNA ID-Nr. #41900 und #41990 (Abb. 6):



Abb. 6: Schematischer Aufbau des PTTG1-Gens und der siRNA-Targetsequenzen

Sie wurden in einer Menge von 40 nmol als trockenes Pulver geliefert. Diese wurden mit 2 ml RNAse-freiem Wasser (Ambion, Austin, USA) verdünnt, um eine Endkonzentration von 20 μ M zu erhalten. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die Länge der siRNAs betrug 21 Nukleotide, die "Sense" und "Antisense" Nukleotidsequenzen (5' \rightarrow 3') sind im Folgenden dargestellt:

PTTG1-siRNA 41900

Sense:	GAU	CUC	AAG	UUU	CAA	CAC	CTT

Antisense: GGU GUU GAA ACU UGA GAU CTC

PTTG1-siRNA 41990

Sense:	GUC	UGU	AAA	GAC	CAA	GGG	Att
Antisense:	UCC	CUU	GGU	CUU	UAC	AGA	Ctt

PTTG1-siRNA 42068

Sense:	GAG	UUU	GUG	UGU	AUU	UGU	Att
Antisense:	UAC	AAA	UAC	ACA	CAA	ACU	Ctg

2.2.2 Kontroll-siRNAs

Die Kontroll-siRNAs wurden zur Überprüfung der Spezifizität des Effekts der PTTG1siRNAs verwendet. Die 19 Nukleotid-langen, Kontroll-siRNAs bestanden aus gleicher Basenzusammensetzung mit jeweils verschiedener Abfolge und wurden von Ambion angefertigt. Die Sequenzen wurden auf Homologien mit bekannten menschlichen Genen des "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) geprüft⁷⁴. Diese Software vergleicht die vom Kunden angegebenen Nukleotidsequenzen mit den Sequenzen der Datenbank und verrechnet die statistische Signifikanz der Übereinstimmungen. Nur Sequenzen, die keine Homologien zu menschlichen Genen zeigten, wurden ausgewählt.

So wurden zwei negative Kontrollen, den PTTG1-siRNA ID. #41900 und #41990 entsprechend, hergestellt und als CT41900 und CT41990 bezeichnet. Die Herstellung einer Kontroll-siRNA für die PTTG1-siRNA 42068 gelang nicht. Die Nukleotidsequenzen (5' \rightarrow 3') der beiden Kontroll-siRNAs waren wie folgt:

Kontroll-siRNA CT41900

Sense:	GAA	CUC	UAC	GCA	CAA	CUU	U	
Antisense:	AAA	GUU	GUG	CGU	AGA	GUU	С	

Kontroll-siRNA CT41990

Sense:	ACC	AAG	GAG	UGC	UGU	AAA	G
Antisense:	CUU	UAC	AGC	ACU	CCU	UGG	U

Zur Messung der Transfektionseffizienz von siRNA-Molekülen wurde eine Fluoreszenz-markierte unspezifische siRNA-Sequenz verwendet. Als Fluoreszenz-farbstoff diente Alexa-Fluor-488 (Qiagen, Hilden). Dieser kann bei einer Wellenlänge von 400-550 nm im Durchflusszytometer gemessen werden. Die Nukleotidsequenz $(5' \rightarrow 3')$ der Alexa-Fluor-488-siRNA wird im Folgenden dargestellt:

siRNA-Alexa-Fluor 488

Sense: UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-Alexa Fluor 488

Antisense: ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT

7,7 μ g der Alexa-Fluor-siRNA wurden auf 250 μ l siRNA-Suspensionspuffer resuspendiert, um eine Endkonzentration von 20 μ M zu erreichen. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -20°C.

2.2.3 GFP-Plasmid

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde neben einem Fluoreszenzmarkierten siRNA-Molekül das Plasmid pmaxGFP verwendet (Amaxa Biosystems, Köln). Dieses kodiert das "green fluorescent protein" GFP des Ruderfußkrebses *Pontellina p.* (Abb. 7). Das Plasmid wurde in einer Konzentration von 0,5 µg/µl geliefert und bei -20°C gelagert.



Abb. 7: Schematische Darstellung des pmaxGFP-Plasmids

Erfolgreich transfizierte Tumorzellen exprimieren das GFP, welches bereits fünf Stunden später mit einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden kann. Die Fluoreszenzstärke der mit pmaxGFP-Plasmid transfizierten Zellen kann mittels Durchflusszytometrie (siehe 2.5) bei einer Wellenlänge von 400-550 nm gemessen werden, um die Transfektionseffizienz in Prozent anzugeben.

2.3 Transfektion

2.3.1 Nukleofektion

Die physikalische Transfektion oder Elektroporation beruht auf einer flüchtigen, reversiblen Porenbildung in der Zellwand durch einen kurzen elektrischen Impuls. Dadurch werden Nukleinsäuren wie siRNAs oder Plasmide aus dem Extrazellulärraum in den Zellkern eingeschleust. Sie findet vor allem für solche Zelllinien Verwendung, die durch chemische oder virale Transfektionsmethoden nur unzureichend zu transfizieren sind.

Amaxa Biosystems[®] (Köln) entwickelte 2001 die Nucleofector[®]-Technologie, die auf unterschiedlichen elektrischen Impulsen sowie Zelllinien-spezifischen Reagenzien basiert. Die möglichen elektrischen Impulse sind als unterschiedliche Programme im Gerät gespeichert, und die Firma liefert Information über die adäquaten Programme und Reagenzien-Kits für jede Zelllinie.

Für die Nukleofektion der Lungenkarzinomzelllinien wurden der "Cell line Nucleofector Kit V" und die Nukleofektionsprogramme T-20, S-20 und P-20 empfohlen. 1 x 10⁶ H1299 Zellen wurden auf 5 ml Medium in kleine Kulturflaschen überführt und für 24 h inkubiert. Danach wurde das alte Medium abgenommen, mit 1 ml Trypsin für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert und anschließend die gelösten Zellen mit 4 ml PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gewaschen. Die 5 ml Zellsuspension wurden in ein 15er Falcon (BD Biosciences) überführt und 5 Minuten bei 800 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann mit 100 µl Amaxa-Lösung resuspendiert und in ein steriles 1,5 ml großes Eppendorf-Röhrchen überführt.

Die Zellen wurden entweder ohne Zugabe einer Nukleinsäure (MOCK-Kontrolle) direkt oder nach Zugabe von 5 µg pmaxGFP oder von verschiedenen Mengen an siRNA-Sequenzen transfiziert. Für die siRNAs wurden Konzentrationen zwischen 1 und 50 nM empfohlen. Nach Zugabe des Plasmids bzw. der siRNAs wurden die Proben mit Hilfe einer Pasteur-Pipette in Amaxa-Küvetten überführt. Diese Küvetten besitzen seitliche Metallplatten, die einen Stromfluss durch deren Inhalt erlauben. Die Küvetten wurden einzeln in den Nukleofektor gestellt. Die Nukleofektion erfolgte mit den Programmen T-20, P-20 oder S-20. Danach wurden

die Proben zügig auf neues, vorgewärmtes Medium in neue Kulturflaschen überführt und im Brutschrank für 5, 24 oder 48 h inkubiert.

2.3.2 Lipofektion

Bei der Lipofektion binden negativ geladene DNA/RNA-Moleküle durch elektrostatische Wechselwirkung an kationische Lipide (Lipofektion) oder Polyaminbasierte Reagenzien und bilden Komplexe, die nach Bindung an die Zelloberfläche durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden (1). Als Lipofektionsreagenz bot sich das HiPerFect-Transfektionsreagenz von Qiagen[®] an, welches sich besonders für siRNAs eignet⁷⁵.

Vorteil bei dieser Methode war, dass die Lipofektion nach dem "Fast-Forward" Protokoll unmittelbar nach der Abtrypsinierung der Zellen in Suspension möglich ist. Es wurden außerdem kleinere Zellmengen als bei der Nukleofektion benötigt: 1×10^5 Zellen (H1299, H23 oder H157) wurden aus der Kulturflasche entnommen und auf 500 µl frisches Medium in 24-Well-Platten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt. Parallel dazu wurden 3 oder 4,5 µl HiPerFect-Reagenz mit einer Endkonzentration von 10 oder 25 nM siRNA bzw. 19,2 nM der Kontroll-siRNA-Alexa Fluor und 100 µl RPMI-Medium ohne Zusätze vermischt, für 15 Minuten inkubiert und tropfenweise auf das Endvolumen der Zellsuspension von 600 µl gegeben. Die Proben wurden für 5, 24, 48 oder 72 h inkubiert.

2.4 Trypanblau-Exklusionsmethode

Die Anzahl lebender Zellen wurde mit der Trypanblau-Exklusionsmethode gemessen. Trypanblau (Biochrom, Berlin) ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Cytosol ein und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Bei zu langer Einwirkzeit des Trypanblau ist ein Anstieg von toten Zellen zu beobachten, da dieser Farbstoff zytotoxisch wirkt. Für die Viabilitätsmessung wurden die Zellen aus der Kulturflasche bzw. – platte wie beschrieben abtrypsiniert und 50 µl der Zellsuspension 1:1 mit 0,5%igem Trypanblau in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Zellzahl wurde dann mittels Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) bestimmt. Die Oberfläche der Zählkammer sowie das dazugehörige Deckglas wurden mit 70%igem Ethanol gereinigt und das leicht angefeuchtete Deckglas auf die Zählkammer gelegt. Das Erscheinen sog. "Newtonringe" zeigte an, dass das Deckglas richtig angebracht und die Tiefe der Zählkammer richtig eingestellt waren. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipette in die Zählkammer gefüllt und die Zellen unter einem Mikroskop gezählt. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus neun großen Quadraten, wobei jedes große Quadrat einem Volumen von 0,1 µl entspricht. Die Zellzahl ergibt sich aus der Formel:

(Anzahl der Zellen / Zahl der ausgezählten Großquadraten) x 10.000 x Verdünnung.

Gezählt wurden die Zellen aus den 4 Eckgroßquadraten, so dass die Endzellzahl der gezählten Zahl x 5.000 entsprach. Diese Zählung wurde viermal wiederholt und die Ergebnisse gemittelt.

Für die Berechnung des Anteils überlebender Zellen bei einem bestimmten Versuchsansatz im Vergleich zur Kontrolle wurde die Zahl vitaler Zellen im Versuchsansatz durch die Zahl vitaler Zellen im Kontrollansatz dividiert und mit 100 multipliziert.

2.5 Durchflusszytometrie

Die "Fluorescence Activated Cell Sorting" (FACS)-Analyse (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA), auch als Durchflusszytometrie bezeichnet, beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Hierbei werden die in einer FACS-Lösung befindlichen Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln den Laserstrahl. Die Zelle emittiert dabei Streulicht oder Fluoreszenzimpulse, woraus man unterschiedliche Eigenschaften der Zelle ableiten kann. Das Streulicht wird durch Zellgröße, die Struktur der Zellmembran sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Die Zellen können damit gezählt und in unterschiedliche Fraktionen sortiert werden. Hierzu

dienen zwei Parameter. Das Vorwärtsstreulicht FSC ("Forward Scatter") wird durch Beugung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht SSC ("Side Scatter") wird durch Brechung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Granularität (Größe und Struktur des Zellkerns etc.). Darüber hinaus kann durch Einsatz verschiedenfarbiger Laser die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden.

Die Rationale der Untersuchung mit Durchflusszytometrie war die Bestimmung der Transfektionseffizienz. Da das GFP-Protein und die Alexa Fluor 488-markierten siRNAs grün fluoreszieren, konnten diese mit einer Wellenlänge von 400 bis 550 nm im FITC-Kanal des Durchflusszytometers detektiert werden.

Nach Separation von 50 µl der Zellsuspension für die Trypanblaufärbung wurden die Proben 5 Minuten bei 800 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet mit 250 µl einer Verdünnung von Formalin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 0,5% auf FACS-Flow (BD Biosciences) in FACS-Röhrchen resuspendiert. Die Fluoreszenzstärke der verschiedenen Proben wurde mittels "Cell Quest" Software (BD Biosciences) wie folgt gemessen: Zunächst erfolgte das "gating" der SSC und FSC auf die Zellpopulation. Danach wurde die Backgroundgrenze mit Hilfe der nicht fluoreszierenden Proben eingestellt und anschließend der Anteil der Zellen über der Backgroundgrenze gemessen, welcher der Transfektionseffizienz entsprach.

2.6 "Clonogenic Assay"

Für die Messung der Effekte einer PTTG1-Herunterregulation auf das klonogene Wachstum der Zellen wurde ein spezieller Zellkultur-Test verwendet. 72 h nach Lipofektion wurden die Zellen abtrypsiniert und gezählt. 500 vitale Zellen aus den lipofizierten sowie aus den unbehandelten Proben wurden dann in kleine Kultur-flaschen mit 10 ml frischem Medium überführt und für 7 weitere Tage inkubiert. Danach wurden die auf dem Boden der Kulturflasche gewachsenen Kolonien unter einem Mikroskop begutachtet. Die Kolonien mit mindestens 50 Zellen wurden gezählt. Bei dieser Zahl konnte davon ausgegangen werden, dass die Zellen, aus denen sich die Kolonien gebildet hatten, ihre Fähigkeit zur Zellteilung behalten hatten. Das klonogene Wachstumspotential in Prozent wurde bei einzelnen

Versuchsansätzen bestimmt, indem die Zahl der Kolonien aus behandelten Zellen durch die Zahl der Kolonien aus Kontrollzellen geteilt und mit 100 multipliziert wurde.

2.7 RNA-Extraktion, Konzentrationsmessung und

Qualitätskontrolle

2.7.1 RNA-Extraktion

Für die Extraktion von RNA aus Zelllinien wurden die Zellen wie beschrieben abtrypsiniert, die Zellsuspension in Eppendorf-Röhrchen überführt und 5 Minuten bei 6000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann mit 350 µl eines Lyse-Puffers bestehend aus RLT-Puffer (Qiagen, Hilden) und 10% ß-Mercapto-Ethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) lysiert. Wenn die RNA nicht direkt extrahiert wurde, wurden die Proben bei -80°C eingefroren.

Für die Isolation der Gesamt-RNA wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet, welcher sich für Zellkonzentrationen bis 1×10^7 eignet. Die RNeasy-Technologie basiert auf der Kombination der Guanidin-Isothiozyanat-Lyse mit der Reinigung durch Silicagel-Membranen und erfolgt in wenigen Schritten nach Angaben des Herstellers.

Zunächst wurden die Proben auf QIAshredder Säulen überführt und zwei Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 350 µl Ethanol 70% homogenisert, auf RNeasy Spin Säulen mit Silicagel-Membrane überführt und zweimal eine Minute bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Diese Membran bindet die RNA, andere Bestandteile der Zellen werden abgewaschen. Danach erfolgte die Verdauung der DNA für 15 Minuten bei 30°C durch Gabe von 80 µl DNAse 1:8 in RDD-Puffer verdünnt. Anschließend wurden die Verdauungsprodukte mit 350 µl RW1-Puffer abgewaschen und 1 Minute bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Nach Gabe von 500 µl RPE-Puffer und einminütiger Abzentrifugierung bei 10.000 rpm sowie 500 µl Ethanol 80% und zweiminütiger Abzentrifugierung bei 10.000 rpm wurde die Säule 5 Minuten bei 13.000 rpm trocken abzentrifugiert und auf ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gesetzt. Am Ende des Vorgangs wurden 30 µl auf 50°C vorgewärmtes RNAse-freies Wasser auf die Säule gegeben und eine Minute bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Das Eluat (totale RNA und Wasser) wurde bei -80°C eingefroren.

2.7.2 RNA-Konzentrationsmessung

Die Konzentration der extrahierten Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der NanoDrop[®]-Technologie gemessen. Der NanoDrop ND-1000 UV-Vis (NanoDrop, Wilmington, USA) ist ein Vollspektrum (220 bis 750 nm)-Spektrophotometer, welches hoch spezifische Analysen von extrem kleinen Proben mit hoher Reproduzierbarkeit ermöglicht. Ein Mikroliter der Probe reicht zur Messung von RNA-Konzentrationen von 2 bis 3000 ng/µl und Berechnung von 260/280- und 260/230-Ratios.

Für die Messung wurde 1 µl des extrahierten RNA-Eluats 1:5 mit Rnasefreiem Wasser verdünnt. 1 µl der Verdünnung wurde dann auf dem Pedestal des NanoDrops pipettiert und bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die vom Gerät angegebenen Konzentrationen wurden anschließend mit fünf multipliziert, um die Gesamt-RNA-Konzentration zu berechnen.

2.7.3 RNA-Qualitätskontrolle

Um die Qualität der extrahierten RNA zu überprüfen wurden in Kollaboration mit dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Universität Düsseldorf Qualitätskontrollen mittels Bioanalyzer®-Technologie durchgeführt. Mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) kann eine Qualitätskontrolle von RNA-Proben durchgeführt werden. Die auf der Elektrophorese basierende LabChip[®]-Technologie fasst die Schritte der Längenseparation, die Aufnahme und Archivierung des Gelbildes und seine Auswertung zu einem einzigen, schnell ablaufenden Prozess zusammen. Die dabei erzeugten digitalen Ergebnisse sind genauer und reproduzierbarer.

Zwei verschiedene Typen von LabChips stehen zur Verfügung, der RNA 6000 Pico Chip für RNA-Konzentrationen zwischen 200 bis 5000 pg/µl und der RNA 6000 Nano Chip für RNA-Konzentrationen zwischen 25 und 500 ng/µl. Nach Messung der

RNA-Konzentration im NanoDrop mit 1 µl der Verdünnung 1:5 wurden die 4 übrig bleibenden µl für die LabChips verwendet. Entsprechend der RNA-Konzentration wurden Nano und Pico Chips durchgeführt.

Die Qualität der RNA wird anhand eines Elektropherogramms dargestellt, bei dem die gemessene Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit abgebildet wird (Abb. 8). Das typische Erscheinungsbild einer intakten Gesamt-RNA-Präparation zeichnet sich durch eine flache Verteilung der Fluoreszenzsignale im zeitlichen Verlauf und zwei hohen Peaks, die der 18S und 28S ribosomalen RNA entsprechen, aus. Degradierte RNA lässt sich anhand einer Verschiebung der Verteilung entsprechend kürzerer RNA-Fragmente zu kürzeren Zeiten (links) und der Abnahme der Fluoreszenzintensitäten der rRNA-Peaks erkennen.



Abb. 8: Gute RNA-Qualität mit den ribosomalen RNA-Peaks 18 S und 28 S (A) und schlechte RNA-Qualität (B)

2.8 Quantitative "real-time" RT-PCR für PTTG1-mRNA

2.8.1 cDNA-Synthese

Für die Messung der PTTG1-mRNA-Konzentration nach siRNA-Transfektion wurde eine quantitative "real time" RT-PCR für PTTG1-mRNA durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten lysiert und die Gesamt-RNA wie beschrieben extrahiert. Bei der Amplifikation von DNA mittels quantitativer "real time" RT-PCR werden DNA-abhängige Polymerasen verwendet. Daher wird zuerst eine Reverse Transkriptase (RT) eingesetzt, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, mit deren Hilfe die extrahierte RNA in einzelsträngige, komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden kann. Die RT benötigt ein kurzes DNA-Oligomer, einen sog. Primer, zur Initiation der cDNA-Synthese. Dadurch werden selektiv mRNAs aus einem Gesamt-RNA-Gemisch revers transkribiert.

Für die cDNA-Synthese wurde das "High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" von Applied Biosystems® (Fostercity, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. 500 ng der Gesamt-RNA wurden in 25 µl RNAse-freiem Wasser verdünnt und mit 25 µl eines sog. Mastermixes ergänzt. Der Mastermix bestand aus 42% RNAse-freiem Wasser, 8% eines 25fach konzentrierten dNTP-Mixes, 20% einer 10fachen Konzentration des Random-Primers, 10% Multiscribe RT sowie 20% eines 10fach konzentrierten RT-Puffer. 25 µl dieses Mastermixes wurden auf jede RNA-Probe pipettiert und mit Hilfe des Mastercycler Gradients[®] (Eppendorf, Hamburg) für zunächst 10 Minuten bei 25°C und dann zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde anschließend bei -80°C aufbewahrt.

2.8.2 Quantitative "real-time" RT-PCR

Die cDNA wurde als Ausgangsprodukt der quantitativen "real time" PCR (RT-PCR) verwendet, um die Konzentration der PTTG1-mRNA in jeder Probe zu quantifizieren. Das Referenz-Gen GAPDH wurde als externe Kontrolle mitgemessen, um die Werte zu normalisieren und eine relative Quantifizierung zu ermöglichen.

Die Quantifizierung der mRNA erfolgt durch Fluoreszenz-Messung. Dafür wurde eine TaqMan-Sonde verwendet, ein spezifisches Oligonukleotid, das an das PCR-Produkt binden kann. Diese Sonde ist mit einem Donor-Fluorochrom an einem Ende und einem Quencher an dem anderen Ende markiert. Ist das Oligonukleotid intakt und wird der Donor-Fluorochrom durch einen Lichtstrahl angeregt, so wird die emittierte Fluoreszenz durch die räumliche Nähe vom Quencher ausgelöst und keine Fluoreszenz gemessen. Während eines PCR-Zyklus wird dennoch die an das PCR-Produkt gebundene TaqMan-Sonde durch die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut und das Donor-Fluorochrom frei gesetzt, so dass die Fluoreszenz gemessen werden kann. Die Fluoreszenz nimmt somit während der PCR mit jedem Zyklus proportional zum PCR-Produkt zu.

In der ersten Phase der Amplifikation einer PCR ist die Templatemenge begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Primer und Polymerase treffen, suboptimal, während in der dritten Phase der Amplifikation die Menge der Produkte (DNA, Pyrophosphat, Monophosphatnukleotide) derart ansteigt, dass es zur Hemmung durch diese kommt, häufiger Produktfragmente miteinander hybridisieren, die Substrate langsam verbraucht werden und letztlich die Polymerasen und Nukleotide durch die Temperaturwechsel langsam zerstört werden. Ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg findet sich idealerweise in der dazwischen liegenden Phase. Für die Messung des Anfangs der exponentiellen Phase wird vom Gerät der CT-Wert ("Threshold Cycle") bestimmt. Dieser gibt den Zyklus an, in dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Der CT-Wert dient als Maß für die Menge an Target-Sequenz, wobei der CT-Wert umgekehrt proportional zum Zweier-Logarithmus der Target-Sequenz-Konzentration ist.

Zur Normalisierung der Target-Sequenz-Konzentration wurde der CT-Wert der PTTG1-spezifischen PCR vom CT-Wert des Referenzgens GAPDH abgezogen (Delta-CT, Δ CT). Δ CT ist damit ein Parameter für die relative Expressionsstärke von PTTG1 in einer Probe. Um die Expressionsstärke zweier Proben miteinander zu vergleichen, wurden die Δ CT-Werte beider Proben voneinander abgezogen ($\Delta\Delta$ CT). Das Ausmaß der unterschiedlichen Expressionen wurde durch die folgende Formel berechnet (Voraussetzung: PCR-Effizienz = 2):

X-fache Hochregulation = $2^{\Delta\Delta CT}$
Dies bedeutet, dass beispielsweise bei einem $\Delta\Delta$ CT von 1 die PTTG1-mRNA in der einen Probe zweifach höher exprimiert ist als in der Kontroll-Probe.

Für die Durchführung der RT-PCR wurde das ABI-Prism 7900 HT "Sequence Detection System" (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. Die RT-PCR wurde in einem 25 µl Reaktionsansatz in Duplikaten in 96-Well-Platten durchgeführt: 50 ng cDNA in einem Endvolumen von 5 µl mit RNAse-freiem Wasser verdünnt, 1,25 µl der 20fach konzentrierten TaqMan-Sonde "Assays-on-demand" (PTTG1 ID-Nr. #Hs00851754_g1 oder GAPDH ID-Nr. #Hs99999905_m1, Applied Biosystems), 12,5 µl "qPCR Master Mix Plus" (Applied Biosystems) und 6,25 µl RNAse-freies Wasser. Die verschiedenen Phasen der RT-PCR waren: Hotstart-Taq Aktivierung bei 50°C für 2 Minuten, Template Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten, 40 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden und bei 60°C für eine Minute. Im Anschluss erfolgte eine Dissoziationskurvenanalyse, die bei 60°C für 15 Sekunden bis 95°C für 15 Sekunden mit einer Heiz- und Kühlrate von 2% aufgezeichnet wurde. Die CT-Werte des Amplifikationsplots wurden mit der SDS 2.0 Software (Applied Biosystems) bestimmt.

2.9 Genexpressionsanalyse mit GeneChips

Zur Analyse der differenziellen Genexpression der Zelllinie H23 nach PTTG1-siRNA-Transfektion und -Ausschaltung wurden mRNA-Präparationen mit Hilfe der "Microarray-Technik" analysiert. Dieses Verfahren ermöglicht es, parallel die Expression von mehreren Tausend Genen zu untersuchen. Dafür wurden GeneChip[®] Arrays HG U133A 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, USA) verwendet, die 22.000 "probe sets" mit 18.400 Transkripten und Varianten sowie 14.500 charakterisierten menschlichen Genen untersuchen.

Nach Extraktion der Gesamt-RNA aus Zell-Lysaten wird die mRNA über reverse Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Diese wird dann durch eine in vitro Transkriptionsreaktion in Anwesenheit biotinylierter Ribonukleotide mit dem "MessageAmp[®] II-Biotin Enhanced Amplification Kit" (Ambion, Austin, USA) nach Angaben des Herstellers in eine Antisense-cRNA umgeschrieben, amplifiziert und zu kürzeren Stücken fragmentiert. Anschließend erfolgt die Hybridisierung dieser Biotin-

markierten RNA-Fragmente auf dem Microarray. Hier werden durch ein kombiniertes Verfahren aus Photolitographie und kombinatorischer Chemie auf einer beschichteten Quartz-Oberfläche von etwa 2 cm² cDNA-Fragmente mit etwa 25 Nukleotiden Länge aufgebracht. Diese Nukleotidlänge ermöglicht eine sehr spezifische Hybridisierung der RNA-Moleküle. Unterschiedliche cDNA-Fragmente sind jeweils in millionenfacher Kopienzahl in definierten Abschnitten ("tiles") des Microarrays vorhanden. An diese Fragmente kann die markierte Proben-RNA komplementär binden. Ungebundene RNA-Moleküle werden abgewaschen. Nach Inkubation mit Streptavidin-Phycoerythrin und einem biotinylierten Anti-Streptavidin-Antikörper kann die Fluoreszenz der spezifisch an die cDNA-Fragmente gebundenen RNA-Moleküle mit einem hochauflösenden Scanner detektiert werden. Die Daten werden mit einem angeschlossenen Computer und spezieller Software analysiert.

Zur Erreichen einer hohen Sensitivität wird jedes Gen durch einen Satz verschiedener cDNA-Fragmente ("probe set") repräsentiert. Zu jedem dieser exakten cDNA-Fragmente ("perfect match") ist ebenfalls ein DNA-Fragment mit einem ausgetauschten Nukleotid in der Mitte der Sequenz ("mismatch") vorhanden, um mögliche unspezifische Bindungen zu erfassen. Die Signale der Bindung der Proben-RNA an diese Mismatch-Fragmente werden von den Perfect-Match-Signalen subtrahiert. Die Fluoreszenzintensität für ein Gen wird über die so korrigierten Signale der hybridisierten RNA-Fragmente eines "probe sets" gemittelt. Um die Daten der einzelnen Microarrays miteinander vergleichen zu können, werden die ermittelten Gesamtfluoreszenzintensitäten der Microarrays auf einen Basis-Wert linear normalisiert. Anhand mathematischer Algorithmen kann aus den normalisierten Daten ein Profil der differenziell exprimierten Gene erstellt werden.

2.9.1 Aufreinigung der doppelsträngigen cDNA

72 h nach Lipofektion wurde die Gesamt-RNA aus Zell-Lysaten wie beschrieben extrahiert und 100 bis 200 ng der RNA über reverse Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Die doppelsträngige cDNA wurde mit Hilfe des "GeneChip Sample Cleanup Moduls" (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Hierbei werden die doppelsträngigen cDNAs an eine Säulen-Matrix gebunden und kontaminierende Bestandteile mit Hilfe von Waschpuffern durch Zentrifugation entfernt. Zunächst wurde das Produkt der

Erst- und Zweitstrangsynthese mit 600 μ l "cDNA Binding Buffer" versetzt und gevortext. Danach wurden 500 μ l dieses Gemischs auf eine in vitro "Transkription cRNA Cleanup" Spin Säule in einem 2 ml Sammelröhrchen geladen und eine Minute bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem Restvolumen des Gemischs wiederholt und der Durchfluss verworfen. Zum Waschen wurden 750 μ l "cDNA Wash Buffer" auf die Säule gegeben und 1 Minute zentrifugiert. Zur Entfernung der Restflüssigkeit aus der Säule wurde diese weitere 5 Minuten zentrifugiert. Die Säule wurde schließlich 1 Minute mit 14 μ l auf 50°C vorgewärmten "cDNA Elution Buffer" inkubiert und die cDNA durch einminütige Zentrifugation in ein 1,5 ml Reaktionsröhrchen eluiert. Die Elution wurde mit 11 μ l des Elutionspuffers wiederholt.

2.9.2 Synthese und Markierung der cRNA

Die in vitro Transkription (IVT) wurde mit Hilfe des "Enzo Bioarray HighYield RNA Transcript Labeling Kit" (Affymetrix, Santa Clara, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion wurde mit 11 μ l (ca. 1 μ g) der gereinigten doppelsträngigen cDNA in einem Gesamtvolumen von 20 μ l wie folgt angesetzt: 11 μ l doppelsträngige cDNA-Probe, 2 μ l 10x HY Reaktionspuffer, 2 μ l 10x Lösung mit biotinylierten Ribonukleotiden (ATP, GTP, CTP, UTP, Bio-UTP und Bio-CTP), 2 μ l 10x DTT, 2 μ l 10x "RNase Inhibitor-Mix", 1 μ l 20x Lösung mit T7-RNA Polymerase. Der Ansatz wurde für 5 h bei 37°C inkubiert und alle 30 Minuten gemischt.

2.9.3 Aufreiningung und Fragmentierung der cRNA

Die Aufreinigung der cRNA wurde ebenfalls mit dem "GeneChip Sample Cleanup Modul" durchgeführt. Das Produkt der IVT (20 µl) wurde mit 80 µl RNAse freiem Wasser, 350 µl IVT "cRNA Binding Buffer" und 250 µl Ethanol vermischt, auf eine "IVT cRNA Cleanup Spin Säule" gegeben und 20 Sekunden bei maximaler Umdrehungszahl abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde ein zweites Mal auf die Säule gegeben, zentrifugiert und anschließend verworfen. Nach Befüllung der Säule mit 500 µl 80%igem Ethanol wurde erst 1 Minute und zur Entfernung von Restflüssigkeit aus der Säule für weitere 5 Minuten zentrifugiert. Die cRNA wurde nach einminütiger Inkubation mit 17 μ I von 50°C warmem RNAse freiem Wasser durch Zentrifugation für 1 Minute in ein 1,5 ml Reaktionsröhrchen eluiert. Die Eluation wurde mit einem Volumen von 11 μ I wiederholt.

Die Konzentration der cRNA wurde durch OD-Messung ermittelt und die Qualität extern mit Hilfe des Bioanalyzers bestimmt. Die Fragmentierungsreaktion wurde mit 10 μ g (mindestens 5 μ g) der gereinigten biotinylierten cRNA durchgeführt. Diese wurde mit 6 μ l des 5x Fragmentierungspuffers aus dem Affymetrix "GeneChip Sample Cleanup Modul" versetzt und mit H₂O-DEPC auf ein Gesamtvolumen von 30 μ l aufgefüllt. Der Ansatz wurde 35 Minuten bei 94°C inkubiert, bevor er zur Hybridisierung auf dem Microarray bereitgestellt wurde.

2.9.4 Hybridisierung der cRNA und Scannen der Microarrays

Für die Genexpressionsanalysen wurden Affymetrix *HG*-Focus GeneChips U133A 2.0 verwendet. Dieser Microarray umfasst 22.000 "probe sets" für die Detektion der Expression von Genen, die ein breites Spektrum unterschiedlicher zellulärer Funktionen repräsentieren. Die Hybridisierung der cRNA, das Waschen und Färben der Microarrays sowie die Messung der Fluoreszenz wurden von einem Mitarbeiter in der Affimetrix "Core-Facility" der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf am Institut für Onkologische Chemie durchgeführt.

Je 10 µg (mindestens 5 µg) in 30 µl der fragmentierten biotinylierten cRNA-Präparationen wurden auf je einen Microarray geladen und über Nacht zur Hybridisierung bei 45°C in einem Affymetrix "GeneChip Hybridization Oven" inkubiert. Wasch- und Färbeschritte wurde mit Hilfe der Affymetrix "GeneChip Fluidics Station 400" nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach einem Waschschritt zur Entfernung nicht gebundener RNA-Moleküle wurden die Microarrays mit Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) markiert. Zur Verstärkung des Signals wurden die Arrays zusätzlich mit biotinylierten Anti-Streptavidin-Antikörpern und einer zweiten SAPE-Lösung inkubiert. Nicht gebundene Moleküle wurden in weiteren Waschschritten entfernt.

2.9.5 Ermittlung der differenziell exprimierten Gene

Die Fluoreszenzsignale der Microarrays wurden mit Hilfe des Affymetrix "Agilent GeneArray Scanners 2500A" mit einer Auflösung von 3 µm Pixeln gemessen. Die Primärdaten wurden mit Hilfe der Affymetrix "MicroArray Suite 5.0 Software" auf einem angeschlossenen Computer analysiert und digitalisiert. Die Daten wurden von einem Bioinformatiker in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Arndt von Haeseler (Institut für Bioinformatik, Universität Düsseldorf; Center of Integrative Bioinformatics, Wien) statistisch ausgewertet. Die Qualitätskontrolle, Normalisierung und Datenanalyse erfolgte mit dem "affy" Paket der "R"-Software. Die Qualität der Probe und Hybridisierung wurde mit Hilfe von Histogrammen der "perfect match" Intensitätsverteilungen, "Box-Plots", 5' nach 3' "RNA-Degradationsplots" und "Scatter-Plots" überprüft. Die Normalisierung der Rohdaten der einzelnen Microarrays erfolgte mit der VSN-Methode ("Variance Stabilization Normalization"). Differenziell exprimierte Gene wurden mit dem SAM-Algorithmus ("Significance Analysis of Microarrays") v1.21 für gepaarte Proben identifiziert. Diese Software beinhaltet eine stufenlos einstellbare Skala für "false discovery rate" (FDR) für signifikant hoch- oder herunterregulierte Gene. Alle Daten wurden unter Verwendung des Zwei Klassen Modus für ungepaarte Daten des Algorithmus über 800 Zyklen permutiert. Die Wahrscheinlichkeit für falsch-positiv ermittelte Unterschiede wurde durch den q-Wert ausgedrückt. Eine signifikant differentielle Genexpression wurde durch einen q-Wert ≤5% und einen p-Wert <0,05 definiert. Um die Zahl der Gene zu reduzieren wurden Gene mit einer mindestens 1,2fachen Expressionsänderung (fold change ≥ 1,2) zwischen den beiden Gruppen (unbehandelten Kontrollen und mit PTTG1-siRNA lipofizierten Proben) betrachtet. Die hierarchische Cluster Analyse wurde mit Hilfe der 'hclust' Funktion durchgeführt.

Die identifizierten Gene wurden mit Hilfe von Datenbanken (KEGG, http://www.kegg.com/kegg/kegg2.html ; PubMed und OMIM, http://www.ncbi.nlm. nih.gov/entrez/query.fcgi) in einen funktionellen Zusammenhang gestellt. Ziel war die Identifikation von nachgeschalteten, posttranskriptionell aktivierten und funktionell zusammen gehörenden Genen zu identifizieren, um dadurch Rückschlüsse auf funktionelle Effekte der PTTG1-Ausschaltung zu gewinnen.

2.10 Western Blot-Analyse

2.10.1 Proteinextraktion

Die Hemmung der PTTG1-Expression auf Proteinebene wurde durch Western Blot gemessen. 72h nach Lipofektion wurden die H23 Zellen mit 150 µl RIPA-Puffer (50mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM NaEDTA, 1% Triton X-100, 0,1% Sodiumdesoxycholat, 0,1% SDS und den Proteinase-Inhibitoren PMSF, 100 µg/ml und Aprotinin, 1µg/ml, Sigma) lysiert. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für 15 Minuten auf Eis auf einem langsam rotierenden Schüttler mit dem Lyse-Puffer inkubiert. Das Zelllysat wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und die ripalöslichen und – unlöslichen Fraktionen durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 6.000 rpm getrennt. Der Überstand mit den Proteinen wurde schließlich in ein neues steriles Eppendorf-Röhrchen überführt.

2.10.2 Proteinbestimmung

Die Konzentration der in den Proben enthaltenen Proteine wurde mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Diese Methode verbindet die Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ durch Proteine in alkalischem Medium (Biuret-Reaktion) mit der kolorimetrischen Detektion des Cu¹⁺ Kations mittels BCA. Das lilafarbene Reaktionsprodukt dieses Assays wird durch einen Chelatkomplex mit zwei Molekülen BCA mit einem Kupferion gebildet. Dieser wasserlösliche Komplex zeigt eine starke Absorption bei 562 nm, welche linear mit der Proteinkonzentration in einem Bereich von 20-2.000 µg/ml ansteigt. Verantwortlich für die Verfärbung mit BCA sind die makromoleküle Struktur der Proteine, die Anzahl an Peptidbindungen und die Anwesenheit der Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin. Die Proteinkonzentrationen werden mit Hilfe einer Verdünnung eines Standard-Proteins bejannter Konzentration ("bovine serum albumin", BSA), gemessen. Jede Proteinkonzentration Standardkurve unbekannte wird anhand der der Verdünnungsreihe bestimmt.

Die Verdünnungsreihe wurde nach Herstellerangaben zubereitet, ebenso das sog. Arbeitsreagenz. Zu diesem wurden dann jeweils 0,1 ml der zu messenden Proteinprobe sowie des Standards pipettiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption in einem Spektrometer im 562 nm-Bereich gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Standardkurve bestimmt.

2.10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die extrahierten Proteine im Überstand wurden anschließend in einem 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Dazu wurde eine "Mini Protean II" Gelkammer (BioRad) verwendet. Die Trennung fand in einem diskontinuierlichen Puffer-System statt. Das Sammel- und Trenngel wurde nach Angaben aus Sambrook, Russell "Molecular cloning", 3. Edition, hergestellt. Der Laufpuffer bestand aus 0,1% SDS, 25 mM Tris-HCI (Pharmacia Biotech) und 192 mM Glycin (Applichem) in 1 Liter Acqua dest, pH 8,3. Für die Elektrophorese wurden pro Probe 20 und 25 µg Gesamtprotein eingesetzt, was einem Volumen von 20 µl entsprach. Das Probenvolumen wurde mit 10 ml 2x Probenpuffer versetzt und das Gemisch für ca. 20 Minuten bei 70°C denaturiert. Der Probenpuffer bestand aus 0,2 M Tris-HCL, 5% Glycerol, 4% SDS, 0,1% Bromphenolblau und 2% ß-Mercapto-Ethanol (alles Sigma) in 1 Liter Acqua dest. und wurde als Stammlösung in sechsfacher Konzentration hergestellt. Anschließend wurden die Proben (unbehandelte, mit unspezifischer siRNA behandelte und mit PTTG1-siRNA behandelte Proben) auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde noch der Standard "Full Range Rainbow Marker" (Amersham Biosciences) mit einem Molekulargewicht von 10.000 bis 250.000 auf das Gel aufgetragen. Das Gel lief für ca. zwei Stunden bei 80 V, bis der Probenpuffer am unteren Ende des Gels angekommen war.

2.10.4 Blotting

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine in dem Gel auf eine Polyvinyl-Difluorid (PVDF)-Membran (Millipore, Billerica, USA) übertragen. Dazu wurden die Membran, das Gel und das Filterpapier (Gel Blotting Paper, Schleicher & Schüll, Brentford,

Großbritannien) für 15 Minuten in Transferpuffer äquibrilliert. Bei dem Transferpuffer handelte es sich um Bjerrum-Puffer bestehend aus 48 mM Tris (Pharmacia Biotech), 39 mM Glycin (Applichem), 0,0375% SDS (Sigma) und 20% Methanol (Merck) in 1 Liter Aqua dest. mit einem pH von 9,2. Die Membran, das Gel und das Filterpapier wurden folgendermaßen von unten nach oben geschichtet: 2 Blätter Filterpapier, die Membran, das Gel und anschließend noch einmal 2 Blätter Filterpapier, wobei möglichst keine Luftblasen dazwischen sein sollten, um den Stromfluss nicht abzulenken. Dieses Sandwich wurde dann in einer "Trans-Blot SD Semi-Dry tranfer Cell" (BioRad) für 45 Minuten bei 15 V geblottet.

2.10.5 Antikörper-Nachweisreaktion und Entwicklung mit ECL-Detection-System

Die Membran mit den Proteinbanden wurde nach dem Blot für 10 Minuten in TBS (20 mM Tris und 150 mM NaCl in 1 Liter Aqua dest., pH 7,2-7,6) gewaschen. Anschließend wurde sie für 60 Minuten in "Blocking Solution" bestehend aus 5% Trockenmilchpulver (Lavita, Kempen, Deutschland) in PBS inkubiert, um mögliche unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren und das sog. Hintergrundrauschen zu minimieren. Nach drei Waschschritten wurde die Membran mit den primären Antikörpern gegen das PTTG1 (Zymed, San Francisco) und gegen das Referenzprotein GAPDH (HyTest, Turku, Finnland) in einer Verdünnung von 1:83 für den PTTG1-Antikörper und 1:7.500 für den GAPDH-Antikörper für 24 h bei 4°C inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit TBS wurde der sekundäre Antikörper (Horseradish Peroxidase-Conjugated Goat Anti-Rabbit Immunglobulin-Specific Polyclonal Antibody, BD Pharmingen) 1:5.000 verdünnt für 1 Stunde inkubiert.

Durch die Konjugation an Peroxidase war es anschließend möglich, die Proteinbanden auf einem Photofilm sichtbar zu machen. Nach drei weitere Waschschritten wurde die Membran mit ECL-Detection-Lösung (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham) für eine Minute inkubiert und dann in einer Dunkelkammer die Banden auf einem Film (Hyperfilm ECL, Amersham) entwickelt.

2.11 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden jeweils im zweifachen Ansatz durchgeführt und mindestens einmal wiederholt. Die Ergebnisse repräsentativer Versuche wurden graphisch dargestellt bzw. als arithmetischer Mittelwert angegeben. Um Schwankungen der Zellkulturexperimente zwischen den einzelnen Versuchen zu normalisieren wurden die Kontrollwerte auf 100% gesetzt und die Messwerte einzelner Versuchsansätze auf die jeweiligen Kontrollen bezogen.

Bei der Bildung arithmetischer Mittelwerte wurde die Standardabweichung angegeben, um eine Abschätzung des Messfehlers von Einzelmessungen zu ermöglichen.

Die Signifikanz der erhaltenen Daten wurde unter Verwendung des Student's t–Testes für ungepaarte bzw. gepaarte Werte mit Hilfe von Excel-Software ermittelt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Evaluierung der Nukleofektion

3.1.1 Untersuchung der Nukleofektionstoxizität für die Zelllinie H1299

Für die Durchführung der funktionellen siRNA-Experimente wurde zunächst untersucht, welches Transfektionsverfahren am geeignetsten für Lungenkarzinomzelllinien ist. Hierfür wurden die Nukleofektion und die Lipofektion evaluiert. Für die Untersuchung der Nukleofektion wurden zunächst Experimente mit der nicht kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie H1299 durchgeführt, wobei 1 x 10⁶ Zellen eingesetzt und die Nukleofektionsprogramme P20, T20 und T14 auf Toxizität getestet wurden. Diese Programme wurden von der Firma Amaxa[®] für die Nukleofektion von Bronchialkarzinom-Zelllinien empfohlen.

Zunächst verglichen wir unbehandelte Proben und Proben, die entweder nur mit dem Amaxa-Nukleofektionspuffer (MOCK-Kontrolle) oder mit Amaxa-Puffer und GFP-Plasmid (GFP) transfiziert wurden. Die Abbildungen 9, 10 und 11 in den folgenden Seiten zeigen die Ergebnisse für jeweils eines der drei Nukleofektionsprogramme, wobei pro Abbildung eine schematische Darstellung der absoluten Zellzahl pro Milliliter (A) sowie der Viabilität (B) im zeitlichen Verlauf dargestellt werden. Die Viabilität bei einem bestimmten Versuchsansatz wurde mit der Trypanblau-Exklusionsmethode als der Anteil überlebender Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ermittelt. Dazu wurde die Zahl vitaler Zellen im Versuchsansatz durch die Zahl vitaler Zellen im Kontrollansatz dividiert und mit 100 multipliziert.

Erwartungsgemäß zeigten die unbehandelten Proben einen Anstieg der absoluten Zellzahl während der Beobachtungszeit um den Faktor zwei bis vier. Im Gegensatz dazu kam es unabhängig vom Nukleofektionsprogramm zu einem Wachstumsstopp der MOCK-Kontrolle mit einer Erholung und einem Anstieg der Zellzahl nach 48 h beim Programm P20. Bei Hinzugabe eines GFP-Plasmids zur Nukleofektionslösung war die Toxizität bei jedem Programm so groß, dass es zu einem kontinuierlichen Abfall der Zellzahl während der Beobachtungszeit kam. Passend dazu kam es zu einer signifikanten Abnahme der vitalen Zellen bei allen Programmen nach Nukleofekton. So betrug beispielsweise der Prozentsatz der überlebenden Zellen 54,01% bei der MOCK-Kontrolle und nur noch 12,02% bei der GFP-Probe 48 h nach Nukleofektion mit dem Programm P20. Die Nukleofektion erwies sich somit als sehr toxisches und damit ungeeignetes Transfektionsverfahren für die Lungenkarzinomzelllinie H1299.



Nukleofektion mit Programm P20



Abb. 9: 3x Nukleofektion mit Programm P20: Darstellung der absoluten Zellzahlmessung der unbehandelten Probe, MOCK-Kontrolle und GFP-Probe nach Nukleofektion (A) und der Viabilität von MOCK-Kontrolle und GFP (B) zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten nach Nukleofektion. Die Unterschiede waren signifikant (*p=0,044; **p=0,005; ***p=0,006)



Nukleofektion mit Programm T20

Α

Abb. 10: Nukleofektion mit Programm T20: Darstellung der absoluten Zellzahlmessung der drei Proben nach Nukleofektion (A) und der Viabilität von MOCK-Kontrolle und GFP (B) zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten nach Nukleofektion.



Nukleofektion mit Programm T14

А



Abb. 11: Nukleofektion mit Programm T14: Darstellung der absoluten Zellzahlmessung der drei Proben nach Nukleofektion (A) und der Viabilität von MOCK-Kontrolle und GFP (B) zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten nach Nukleofektion.

3.1.2 Untersuchung der Nukleofektionseffizienz

Die Effizienz der Nukleofektion wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die Anzahl der mit GFP-Plasmid transfizierten, fluoreszierenden Zellen wurde mit der Anzahl der nicht transfizierten Zellen verglichen. Dafür wurde die Backgroundgrenze mit Hilfe der nicht fluoreszierenden Proben eingestellt und anschließend der Anteil der Zellen über der Backgroundgrenze gemessen, welcher der Transfektionseffizienz entsprach.

Abb. 12 zeigt das Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung eines repräsentativen Experiments.



Abb. 12: Beispiel einer durchflusszytometrischen Messung von H1299-Zellen 5 h nach Nukleofektion mit dem Programm P20. Die Werte in rot entsprechen dem Anteil der Zellen über der Backgroundgrenze. Effizienz von 65,11% (68,56 – 3,45%)

Die Transfektionseffizienzen bei Verwendung der drei Nukleofektionsprogramme sind in Abb. 13 zusammengefasst. Der Anteil an GFP-exprimierenden Zellen variierte zwischen 45 und 70%, wobei das Programm T14 die beste Transfektionseffizienz von 70% 5 h nach Nukleofektion zeigte. Die Transfektion war jedoch nicht stabil, was sich in einem kontinuierlichen Abfall der GFP-positiven Zellen in den folgenden 43 h widerspiegelte.



Effizienz nach Nukleofektion mit P20

А





Abb. 13: Effizienz der Nukleofektion: Darstellung der Nukleofektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie für die Programme P20 (dreimalige Nukleofektion), T20 und T14 zu jedem Untersuchungszeitpunkt. Die beste Effizienz wurde 5 h nach Nukleofektion mit dem Programm T14 erreicht. Die Zahl der fluoreszierenden Zellen nahm im Verlauf ab.

3.2 Evaluierung der Lipofektion

3.2.1 Untersuchung der Lipofektionstoxizität für die NSCLC-Zelllinien H1299,H23 und H157

Angesichts der unzureichenden Nukleofektionsergebnisse wurde die Transfektion der Zelllinien H1299, H23 und H157 mittels Lipofektion weiter untersucht.

Hierbei wurden zunächst 1 x 10^5 Zellen angesetzt. Die getestete Menge an Lipofektionsreagenz HiPerFect[®] betrug 3 und 4,5 µl und die Konzentrationen von siRNA-Alexa-Fluor[®] 9,6 und 19,2 nM. Die Messung der absoluten Zellzahl fand nach 5, 24, 48 und 72 h statt. Die Abb. 14 zeigt die Konzentrations- und Zeit-abhängige absolute Zellzahl (A) und die Viabilität (B) nach Lipofektion der Zelllinie H1299.

Die Lipofektion zeigte kaum Toxizität, was sich in einer etwa 20% geringeren Zellzahl und etwa 5% geringeren Viabilität der transfizierten im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen nach 72 h widerspiegelte.



Lipofektion der Zelllinie H1299

Α



Abb. 14: Lipofektion von 1 x 10⁵ Zellen H1299 mit 3 oder 4,5 μl des Lipofektionsreagenzes HiPerFect[®] und 9,6 oder 19,2 nM Alexa Fluor[®]-siRNA. Die absolute Zellzahl (A) sowie die Viabilität (B) nach 5, 24, 48 und 72 h eines repräsentativen Beispiels aus drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

Da sowohl die Toxizität als auch die Effizienz (siehe 3.2.2) für die verschiedenen Lipofektionsreagenz- und Alexa-Fluor-Konzentrationen vergleichbar waren, wurde für die weiteren Experimente die niedrigste Konzentration an Lipofektionsreagenz ausgewählt. Zur Untersuchung der Adenokarzinom-Zelllinie H23 wurden deshalb 3 µl des Lipofektionsreagenzes für die MOCK-Kontrolle sowie 9,6 nM Alexa-Fluor-siRNA für die positive Kontrolle verwendet (Abb. 15).



B Viabilität der Zelllinie H23 nach Lipofektion



Abb. 15: Lipofektion von 1 x 10^5 H23-Zellen mit 3 µl HiPerFect[®] und 9,6 nM Alexa Fluor[®]. Die absolute Zellzahl (A) sowie die Viabilität (B) nach 24, 48 und 72 h sind dargestellt. Gezeigt sind der Mittelwert und die Standard-Abweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Zellzahl-Unterschiede zwischen unbehandelter und MOCK-Kontrolle sowie der Alexa-Probe nach 72h h waren signifikant (p<0,04), zwischen der MOCK-Kontrolle und der Alexa-Probe nicht (p=0,22)

Vergleicht man die Lipofektion der Zelllinie H1299 mit der Zelllinie H23, so zeigen sich ähnliche Ergebnisse. Die unterschiedliche Skalierung ist zwecks Übersichtlichkeit verwendet worden. Der Prozentsatz überlebender Zellen nach Lipofektion mit HiPerFect[®] und Alexa-Fluor-siRNA[®] beträgt bei der Zelllinie H23 ca. 75% gegenüber etwa 80% bei der Zelllinie H1299.

Bei der H157 wurde die Zellzahl und die Viabilität nur 72 h nach Lipofektion bestimmt. Hier zeigte sich eine Zellzahl von 204.000/ml in der mit HiPerFect[®] behandelten Probe in Vergleich zu 222.000/ml in der unbehandelten Kontrolle. Die Viabilität lag somit bei 90,9%.

Zusammengefasst zeigt die Lipofektion eine deutlich niedrigere Toxizität als die Nukleofektion. Die Viabilität der Zellen nach Transfektion mit dem kationischen Lipid betrug bei jedem Untersuchungszeitpunkt mehr als 70% während bei der Nukleofektion diese bereits nach 48 h unter 50% mit fallender Tendenz lagen.

Der Vergleich zwischen den drei NSCLC-Zelllinien zeigte ähnliche Viabilität für die H1299 und die Adenokarzinom-Zelllinie H23 (75 bis 80%) wobei die Plattenepithelkarzinom-Zelllinie H157 die Lipofektion mit einer Viabilität über 90% am besten vertrug.

Die Lipofektion mit HiPerFect[®] ist daher ein gering toxisches Verfahren für die Transfektion von NSCLC-Zelllinien (H1299, H23 und H157) mit Überlebensraten von über 75% der Zellen.

3.2.2 Untersuchung der Lipofektionseffizienz

Zur Messung der Transfektionseffizienz wurde der Anteil fluoreszierender Zellen nach Lipofektion der Fluoreszenz-markierten Alexa-Fluor-siRNA-Moleküle mit dem Durchflusszytometer ermittelt. Auch für die durchflusszytometrische Messung nach Lipofektion wurde eine Backgroundgrenze mit Hilfe der nicht fluoreszierenden Proben eingestellt.

Hier ließ sich interessanterweise ein viel homogeneres Verteilungsmuster als bei der Nukleofektion mit GFP-Plasmid (vergleiche Abb. 10) erkennen. Die Abb. 16 zeigt die Messung der Zelllinie H1299 72 h nach Lipofektion mit 3 μ l HiPerFect[®] und 9,6 nM siRNA-Alexa-Fluor.



Abb. 16: Durchflusszytometrische Messung von H1299-Zellen 72 h nach Lipofektion. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel aus fünf unabhängigen Experimenten. Der Mittelwert der Transfektionseffizienz aus allen Experimenten betrug 91,05%.

In der Messung der Zelllinie H1299 fielen keine signifikanten Unterschiede zwischen 3 oder 4,5 µl Lipofektionsreagenz und 9,6 oder 19,2 nM siRNA-Alexa-Fluor auf. Zu jedem Zeitpunkt lag die Effizienz für jeden Ansatz über 88%. Die Abb. 17-A zeigt die Effizienz der Lipofektion mit 3 und 4 µl HiPerFect sowie 9,6 bzw. 19,2 nM Alexa-Fluor-siRNA. Die beste Effizienz wurde mit 4,5 µl HiPerFect und Alexa-Fluor 19,2 nM nach 48 h, wobei der Unterschied zu den anderen Proben weniger als 5% betrug.

Bei der Zelllinie H23 lag die Effizienz über 85%, mit einem Maximum bei 94% nach 72 h (Abb. 17-B auf der folgenden Seite).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Lipofektion mit HiPerFect[®] eine wenig toxische Methode darstellt, um siRNA-Moleküle mit Effizienzen zwischen 85 und 95% in Lungenkarzinom-Zelllinien zu transfizieren.



A Effizienz der Lipofektion der Zelllinie H1299



Abb. 17: Lipofektionseffizienz der Zelllinien H1299 und H23: Effizienz mit 3 oder 4,5 µl HiPerFect[®] sowie 9,6 und 19,2 nM Alexa-Fluor[®]-siRNA bei der Zelllinie H1299. Die Effizienz betrug zu jedem Zeitpunkt mehr als 85% (A). Bei der Zelllinie H23 lag der Anteil der fluoreszierenden Zellen ebenfalls über 85% (B). Gezeigt sind die Mittelwerte aus fünf Experimenten (H1299) bzw. drei Messungen (H23) ohne Standard-Abweichungen zwecks Übersichtlichkeit.

3.3 Effekt der PTTG1-siRNA-Transfektion auf die PTTG1-mRNA-Expression

3.3.1 RNA-Qualitätskontrolle

Nach Etablierung der Lipofektion als gering toxische, effektive Transfektiosmethode für NSCLC-Zelllinien erfolgte die Lipofektion mit PTTG1-siRNAs. Die Effektivität dieser siRNAs wurde auf mRNA-Ebene mittels "real-time" RT-PCR bestimmt. Werden durch RNAi die PTTG1-mRNAs gespalten, so sind niedrigere PTTG1-mRNA-Konzentrationen in den lipofizierten als in den unbehandelten Proben zu erwarten.

Für die quantitative RT-PCR wurde bei jeder Zelllinie zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt die Gesamt-RNA wie in 2.8.1 beschrieben extrahiert und anschließend eine Qualitätskontrolle mittels Bioanalyzer[®] (2.8.3) durchgeführt. Alle extrahierten RNAs zeigten in dieser Analyse eine gute Qualität und konnten für die "real time" RT-PCR verwendet werden.



Abb. 18: Ergebnisse eines repräsentativen Nano-Chips mittels Bioanalyzer[®]. *NR* Nano-Chip-Referenz, *1* unbehandelte Kontrolle, *2* MOCK-Kontrolle, *3* Kontroll-siRNA CT41900, *4* Kontroll-siRNA CT41990, *5* PTTG1-siRNA 41900, *6* PTTG1-siRNA 41990, *7* PTTG1-siRNA 42068. Abb. 18 zeigt als Beispiel die Qualitätskontrollenergebnisse eines Nano-Chips bei der Zelllinie H23 72 h nach Lipofektion mit den beiden Kontroll-siRNAs (3 und 4) und die drei PTTG1-siRNAs (5, 6 und 7) sowie die unbehandelte (1) und MOCK-Kontrolle (2). Alle Proben zeigen das typische Erscheinungsbild einer intakten Gesamt-RNA-Präparation, mit zwei hohen Peaks, die der 18S und 28S ribosomalen RNAs entsprechen.

3.3.2 Quantifizierung der PTTG1-mRNA-Hemmung in den NSCLC-Zelllinien

Nach Extraktion der totalen RNA und Synthese der cDNA mittels Reverse-Transkriptase-PCR wurden quantitative "real-time"-PCRs durchgeführt, um die Konzentration der PTTG1-mRNA jeder Probe zu quantifizieren. Das Referenz-Gen GAPDH wurde als externe Kontrolle mitgemessen, um die Werte zu normalisieren und eine relative Quantifizierung zu ermöglichen. Das Ausmaß der PTTG1-Expression jeder Probe wurde durch die Formel X-fache Hochregulation = 2 $^{\Delta\Delta CT}$ (siehe 2.9.2) berechnet.

Zunächst wurden "real time" RT-PCRs der Zelllinie H1299 24, 48 und 72 h nach Lipofektion durchgeführt. Unbehandelte Kontrolle, MOCK-Kontrolle, sowie Zellen, die mit der Kontroll-siRNAs CT41900 oder CT41990 oder mit den drei PTTG1-siRNA 41900, 41990 oder 42068 transfiziert worden waren, wurden analysiert. Die Ergebnisse der PCRs sind in der Abb. 19 auf der folgenden Seite dargestellt.

Nach Transfektion der drei spezifischen siRNAs zeigte sich eine zeitabhängige Hemmung der mRNA-Expression. Die stärkste Hemmung von 97% fand sich 72 h nach Tranfektion von PTTG1-siRNA 41990. Die Verwendung des Transfektionsreagenzes alleine (MOCK-Kontrolle) sowie die Transfektion der Kontroll-siRNA CT41900 zeigten keinen Effekt auf die PPTG1-mRNA, während das zweite Kontroll-siRNA-Molekül CT41990 72 h nach Transfektion zu einer geringen, nicht signifikanten (p=0,054) Hemmung der PTTG1-mRNA führte.



PTTG1-mRNA-Hemmung bei der Zelllinie H1299

Abb. 19: Menge an PTTG1-mRNA 24, 48 und 72 h nach Lipofektion der Zelllinie H1299. Die Hemmung der PTTG1-mRNA wird bei jeder Probe und zu jedem Zeitpunkt in Prozent dargestellt. Gezeigt wird bei 72 h der Mittelwert mit Standardabweichung aus zwei Experimenten. Der Unterschied in der Expression zwischen der MOCK-Kontrolle und der CT41990-Probe war nicht signifikant (p=0,054), die PTTG1-siRNA-Proben zeigten eine signifikant (*p<0,012) verminderte Expression.

Abb. 20 auf der folgenden Seite zeigt ein repräsentatives RT-PCR-Experiment. 72 h nach Lipofektion der siRNAs sind die PTTG1-spezifischen PCR-Kurven im Vergleich zu den Kurven der unbehandelten oder mit CT41900 bzw. CT41990 lipofizierten Kontrollen nach rechts verschoben, was für eine geringere Konzentration an PTTG1-mRNA in den mit PTTG1-siRNA transfizierten Proben spricht. Die PCR-Kurven für das Referenzgen GAPDH bleiben für alle Proben unverändert.



Abb. 20: Quantitative "real time" RT-PCR für die PTTG1-RNA in der Zelllinie H1299 72 h nach Lipofektion mit den Kontroll-Sequenzen CT41900 und CT41990 oder den spezifischen PTTG1-siRNAs 41900, 41990 und 42068. Dargestellt sind die PCR-Kurven der GAPDH- sowie PTTG1-spezifischen PCR eines repräsentativen Experiments.

Für die Adenokarzinom-Zelllinie H23 wurden ebenfalls RT-PCRs 24, 48 und 72 h nach Lipofektion durchgeführt. Abb. 21 zeigt die Ergebnisse eines Experiments. Hier konnte mit dem besten siRNA-Molekül zunächst eine Hemmung von 80% erzielt werden. Das Kontroll-siRNA-Molekül CT41990 hatte bei H23 keinen Effekt, die Kontroll-siRNA CT41990 führte dagegen zu einer 22%igen Erhöhung der PTTG1-Expression nach 48 h, die CT41900 jedoch zu einer 20%igen Verminderung der PTTG1-mRNA nach 72 h.



PTTG1-mRNA-Hemmung bei der Zelllinie H23

Abb. 21: Menge an PTTG1-mRNA 24, 48 und 72 h nach Lipofektion. Die relative PTTG1-Expression wird bei jeder Probe und zu jedem Untersuchungszeitpunkt in Prozent dargestellt. Gezeigt wird ein einmaliges Experiment.

Da die spezifische PTTG1-siRNA-Sequenz 41900 eine nicht so starke Hemmung der mRNA wie die Sequenzen 41990 und 42068 erreichen konnte, wurden diese und ihre entsprechende Kontrolle CT 41900 für die weiteren Experimente nicht mehr verwendet.

Die Experimente mit der Zelllinie H23 wurden anschließend viermal wiederholt und PCRs nach 72 h durchgeführt. Interessanterweise nahm die Hemmstärke in den folgenden Experimenten zu und die PTTG1-Expression konnte mit der PTTG1-siRNA 41990 um 95% signifikant gehemmt werden. Die entsprechende Kontrolle CT41990 zeigte eine durchschnittliche, nicht signifikante (p=0,13) PTTG1-mRNA-Hemmung um 8% (Abb. 22):



PTTG1-mRNA-Hemmung bei der Zelllinie H23 nach 72 h

Abb. 22: Menge an PTTG1-mRNA 72 h nach viermaliger Lipofektion der Zelllinie H23. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier Experimenten. Die Hemmung der PTTG1-Expression mit der Kontroll-Sequenz CT41990 war nicht signifikant (p=0,13). Die beiden PTTG1-siRNA-Moleküle 41990 und 42068 konnten eine hoch signifikante (*p<0,00001) Herunterregulation der PTTG1-Expression auf 5% erreichen.

Das "amplification plot" eines repräsentativen Experiments der quantitativen RT-PCR 72 h nach Lipofektion der Zelllinie H23 ohne die CT41900- und die PTTG1siRNA-41900-Sequenzen wird in der Abb. 23 auf der nächsten Seite gezeigt. Betrachtet man die PCR-Kurven, so wird der hemmende Effekt der PTTG1-siRNA-Sequenzen deutlicher.



Abb. 23: Quantitative "real time" RT-PCR für die PTTG1-RNA der Zelllinie H23 72 h nach Lipofektion mit der Kontroll-Sequenz CT41990 oder den spezifischen PTTG1-siRNAs 41990 und 42068. Dargestellt sind die PCR-Kurven der GAPDH- sowie PTTG1-spezifischen PCR eines repräsentativen Experiments.

Die Plattenepithelkarzinom-Zelllinie H157 wurde ebenfalls 72 h nach Lipofektion auf molekularer Ebene viermal untersucht. Hierbei bewirkte die Lipofektion mit der Kontroll-siRNA CT 41990 eine Hochregulation des PTTG1 um 10 bis 30%, die jedoch nicht signifikant war (p=0,13). Die PTTG1-siRNAs 41990 und 42068 erreichten eine signifikante (p<0,0005) Hemmung der mRNA-Menge um ca. 60%. Abb. 24 stellt die Ergebnisse graphisch dar.



PTTG1-mRNA-Hemmung bei der Zelllinie H157 nach 72h

Abb. 24: Relative PTTG1-mRNA-Konzentration 72 h nach Lipofektion der Zelllinie H157. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier Experimenten. Der Unterschied in der Expression zwischen unbehandelter Kontrolle und CT41990 war nicht signifikant (p=0,13). Die PTTG1-Expression konnte nach Lipofektion mit den PTTG1-siRNA-Molekülen 41990 und 42068 signifikant (*p<0,0005) auf ca. 40% unterdruckt werden.

Zusammengefasst konnte man 72 h nach Lipofektion mit zwei der drei PTTG1-siRNA-Sequenzen eine effektive Hemmung der PTTG1-mRNA-Expression um ca. 95% in den Zelllinien H1299 und H23 erreichen. Die Kontrollsequenz CT 41990 hemmte bei der Zelllinie H1299 um ca. 20%, bei der H23 zwischen 2 und 20% und bei der H157 stimulierte die PTTG1-Expression um 10 bis 30%.

3.4 Effekt der PTTG1-siRNA-Transfektion auf die Protein-

Expression

Die Herunterregulation des PTTG1-Gens wurde auch auf Proteinebene untersucht. Hierfür wurde die Zelllinie H23 verwendet, weil diese auch für die folgenden Genexpressionsanalysen (3.5) zum Einsatz kam.

72 h nach Lipofektion mit PTTG1-41990 und CT41990 wurden H23 Zellen lysiert und die Proteinextrakte mittels Western-Blot unter Verwendung eines PTTG1spezifischen Antikörpers untersucht. Abb. 25 zeigt das Ergebnis eines Western-Blots. Neben verschiedenen unspezifischen Banden zeigt sich auf Höhe von 23 KDa ein Fehlen der PTTG1-Banden bei den mit PTTG1-siRNA lipofizierten Proben. Die unbehandelten und die mit Kontroll-siRNA CT41990 lipofizierten Proben weisen die PTTG1-Bande auf. Trägt man 20 µg Protein auf, so sind die Banden stärker nachzuweisen.



Abb. 25: Western-Blot-Analyse eines Proteinlysats der Zelllinie H23 72 h nach Lipofektion mit der Kontroll-siRNA CT41990 und der PTTG1-siRNA 41990. Nachweis der PTTG1-Proteinbanden (23 kDa) in den unbehandelten und CT41990-Proben, fehlende Banden in der PTTG1-41990-Probe. Proteinlysate wurden in zwei Konzentrationen aufgetragen.

Auch das Referenzprotein GAPDH wurde mittels Western-Blot untersucht. Hierbei zeigten sich uniforme Banden bei allen Proben auf Höhe von 38 KDa (Abb. 26).



Abb. 26: Western-Blot-Analyse eines Proteinlysats der Zelllinie H23 72 h nach Lipofektion mit der Kontroll-siRNA CT41990 und der PTTG1-siRNA 41990. Nachweis der GAPDH-Proteinbanden in allen Proben.

Insgesamt zeigten die "real time" RT-PCR- und Western-Blot-Ergebnisse eine vollständige Herunterregulation des PTTG1-Gens in der Adenokarzinom-Zelllinie H23 72 h nach Transfektion mit dem siRNA-Molekül PTTG1-41990. Die Kontroll-Sequenz CT41990 bewirkte keinen signifikanten Effekt auf RNA- oder Protein-Ebene.

3.5 Transkriptionelle Effekte in der Zelllinie H23 durch PTTG1-Herunterregulation

Um Hinweise auf funktionelle Effekte nach PTTG1-Herunterregulation zu bekommen wurde die differenzielle Genexpression nach PTTG1-siRNA-Transfektion mittels Genexpressionsanalysen untersucht.

Da das PTTG1-siRNA-Molekül 41990 am effizientesten war und für dieses auch ein korrespondierendes Kontroll-siRNA-Molekül existierte, wurde dieses für die folgenden Experimenten verwendet. Vorherige Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass die Adenokarzinom-Biopsate die höchste Menge an PTTG1mRNA-Konzentrationen aufwiesen (siehe 1.2.4). Daher wurde die Adenokarzinom-Zelllinie H23 mit der Kontroll-Sequenz CT41990 und dem PTTG1-siRNA-Molekül 41990 fünfmal lipofiziert (Abb. 27). Die bisherigen Ergebnisse (Vgl. Abb. 22) wurden bestätigt.



Abb. 27: Lipofektion der Zelllinie H23 für die Genexpressionsanalysen. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf Experimenten sowie ein repräsentatives Beispiel einer RT-PCR 72 h nach Lipofektion mit Kontroll-siRNA CT41990 und PTTG1-siRNA 41990. Kein signifikanter Unterschied (p=0,051) zwischen unbehandelter und CT41990-Kontrolle. Signifikante Hemmung (*p<0,0000003) der PTTG1-Expression nach Lipofektion mit PTTG1-siRNA 41990.

Für die Genexpressionsanalysen wurden GeneChip[®] Arrays HG U133A 2.0 verwendet, welche 22.000 "probe sets" mit 18.400 Transkripten und Varianten sowie 14.500 charakterisierten menschlichen Genen erfassen. Anschließend wurde eine "Significance Analysis of Microarrays" (SAM) durchgeführt.

Die Ergebnisse ergaben Fold Change (FC)-Werte zwischen 0,19 und 2,86. Gene mit einem Fold Change von nahezu 1 zeigten keine differenzielle Expression. Die Gene mit einem Fold Change größer als 1,500 bzw. kleiner als 0,666 (1/1.500) wurden ausgewählt. Bei einer "false discovery rate" von 2,58% resultierten hieraus 511 Gene, 305 davon waren signifikant stark hoch und 206 herunter reguliert.

Abb. 28 zeigt das SAM-Diagramm mit den 511 Genen, wobei jedes hoch regulierte Gen einem roten und jedes herunter regulierte Gen einem grünen Punkt entspricht, mit einem Mittelwert von Falschpositiven von 13,2 und einer "false discovery rate" von 2,58 %.



Abb. 28: "Significance Analysis of Microarrays" (SAM)-Punktdiagramm. Jedes hoch regulierte Gen entspricht einem roten und jedes herunter regulierte Gen einem grünen Punkt. Das PTTG1 entspricht dem grünen Punkt unten links und das Dicer-1 dem roten oben rechts.

Für die weitere Analyse wurden die Gene mit einer statistischen Signifikanz von p<0,05 und einem q-Wert <5% beschränkt. Signifikante Gene aus dem Stoffwechsel sowie diejenigen, die nicht eindeutig zuzuordnen waren, wurden ausgeschlossen. Andere Gene, deren "Fold Change" knapp unter 1,500 bzw. über 0,666 lag, jedoch zu einem wichtigen, auffälligen Pathway verknüpft waren, wurden eingeschlossen. Insgesamt wurden somit 79 Gene ausgewählt, die in Tab. 2 der folgenden Seite aufgeführt werden. Diese Gene wurden in sechs verschiedene funktionelle Untergruppen eingeteilt:

- 1. Zellzyklus
- 2. Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg
- 3. Wachstumsfaktoren
- 4. Apoptose
- 5. WNT-Kalzium
- 6. Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrix

Die PTTG-Familie ist am Anfang der Tabelle getrennt aufgeführt. Das PTTG1 wies mit 0,192 den kleinsten "Fold Change"-Wert aller Gene auf. Diese starke Herunterregulation stellte eine optimale und gewünschte Ausgangssituation für die Beurteilung der weiteren Gene dar. Auffällig bei der PTTG-Familie war, dass nach Ausschaltung des PTTG1 auch das PTTG3-Gen sehr stark herunterreguliert wurde, während das PTTG2 mit einem "Fold Change" von ca. 0,8 kaum betroffen wurde.

Genname	Gensymbol	Fold Change	P-Wert
pituitary tumor transforming gene 1	PTTG1	0,192	0,00008
pituitary tumor transforming gene 2	PTTG2	0,797	0,0003
pituitary tumor transforming gene 3	PTTG3	0,230	0,0004
Zellzyklus			
cyclin dependent kinase inhibitor 2A, p16	CDKN2A	1,383	0,001
cyclin-dependent kinase inhibitor 2C, p18	CDKN2C	2,099	0,0001
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, p21	CDKN1A	1,570	0,004
cyclin-dependent kinase 2	CDK2	0,637	0,003
cyclin-dependent kinase 4	CDK4	0,642	0,00004
cyclin-dependent kinase 6	CDK6	0,860	0,01
checkpoint homolog (S. pombe)	CHK1	0,653	0,0005
minichromosome maintenance deficient 2, 3, 4, 5, 7, 10	MCM2, 3, 4, 5, 7, 10	0,593 – 0,743	0,00005 - 0,03
structural maintenance of chromosomes 1-like 1	SMC1	0,795	0,02
MAPK-Signalweg			
mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1, ERK1	0,645	0,0003
RAS p21 protein activator 1	RASA1	0,572	0,0005
MYC binding protein 1, 2	MYCBP, 2	1,525 – 1,393	0,004 - 0,01
dual specificity phosphatase 1, 3	DUSP1, 3	0,800 – 0,879	0,006 - 0,01
dual specificity phosphatase 2, 14, 22	DUSP2, 14, 22	1,231 – 1,306	0,003 - 0,02
Wachstumsfaktoren			
transforming growth factor, alpha	TGFA	1,742	0,007
transforming growth factor, beta 2	TGFB2	1,210	0,001
transforming growth factor, beta receptor 2	TGFBR2	0,583	0,00007
transforming growth factor, beta receptor 3	TGFBR3	1,584	0,009
insulin-like growth factor 2 receptor	IGF2R	1,383	0,002
insulin-like growth factor binding protein 3, 6	IGFBP3, 6	0,562 - 0,805	0,001 - 0,002
platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGFA	1,451	0,002
platelet derived growth factor C	PDGFC	1,435	0,01
thrombospondin 1	THBS1	1,475	0,002
vascular endothelial growth factor C	VEGFC	1,564	0,001

Apoptose			
apoptotic peptidase activating factor 1	APAF-1	1,614	0,0002
growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	GADD45B	1,505	0,03
B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)	BCL11A	1,459	0,0003
BH3 interacting domain death agonist	BID	1,301	0,001
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A, 10b, 21	TNFRSF1A, 10b, 21	1,248 – 1,387	0,01 - 0,003
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b	TNFRSF6B	0,614	0,0003
DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide	DFF45	0,664	0,0006
Ca2+ / WNT-Signalweg			
guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide	GNAQ	1,767	0,0006
phospholipase C, epsilon 1	PLCE1	1,397	0,004
phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)	PLCB1	1,258	0,01
frizzled homolog 6 (Drosophila)	FZD6	1,593	0,005
nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	NFAT5	1,311	0,01
G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A	GPCR5A	0,767	0,006
Adhäsionsmoleküle / ECM			
collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) binding protein	COL4A3BP	1,586	0,02
matrix metallopeptidase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	MMP2	1,429	0,001
laminin, gamma 1 (formerly LAMB2), 2	LAMC1, 2	1,329 - 1,348	0,0008 – 0,002
integrin, beta 5	ITGB5	1,980	0,0003
integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	ITGA2	1,219	0,001
integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	ITGA4	1,374	0,007
Integrin, alpha 6	IIGA6	0,436	0,0006
integrin, beta 4 binding protein	ITGB4BP	0,707	0,0002
fibronectin type III domain containing 3A, 3B	FNDC3A, 3B	1,602 – 2 011	0,00008 – 0 004
fibronectin 1	FN1	1,320	0,0002
gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	GJA1	1,403	0,003
WAS protein family, member 2	WASF2	0,806	0,008
actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 2, 4, 5-like	ARPC1B, 2, 4, 5L	0,694 – 0,791	0,0002 – 0,007
actinin, alpha 1, 4	ACTN1, 4	0,790- 0,804	0,005 – 0,009
ras homolog gene family, member A, B, C, G	RHOA, B,C, G	0,508 – 0.809	0,007 - 0,03

Tabelle 2: Die 79 ausgewählten, hoch- oder herunterregulierten Gene sind in sechs funktionellen Gruppen eingeteilt. Die FC-Werte (PTTG1-siRNA / Kontroll-siRNA) der hochregulierten Gene sind rot, der herunterregulierten grün dargestellt. P-Wert aus T-Test für gepaarte Proben, q-Value aller Gene <5%.
In der ersten Gruppe fand sich eine Reihe von Zellzyklus-assoziierten Genen, die funktionell zusammenhängen. Das Gleichgewicht zwischen Kinasen und Inhibitoren in den Zellzyklusphasen G1-S ist entscheidend für das Übergehen in die G2- und Mitose-Phase. Hier waren die Zellzyklus aktivierenden Zyklin-abhängigen Kinasen 2, 4 und 6 herunterreguliert und deren Inhibitoren 2A (p16), 2C (p18) und 1A (p21) hochreguliert. Interessanterweise waren die Zykline D, E und A selbst in ihrer Expression nicht beeinträchtigt. Darüber hinaus fand sich eine Hochregulation des GADD45B-Gens, das eine Rolle im Zellwachstum, bei der Apoptose und der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung spielt. Ferner zeigten die für die Chromosomen-Erhaltung verantwortlichen und in der Mitose-Phase mitwirkenden Gene MCM2, 3, 4, 5, 7, 10 und SMC1 eine geringere Expression nach PTTG1-Ausschaltung. Insgesamt spricht diese Reihe an Veränderungen für eine reduzierte Zellzyklus-Aktivität.

Betrachtet man die differenziell exprimierten Gene des Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)-Signalwegs, so zeigen sich keine kohärenten Ergebnisse. Dieser Signalweg ist unter anderem für die Proliferation und Differenzierung der Zelle verantwortlich und ist verknüpft mit dem Zellzyklus- und Apoptose-Signalweg. Als interessanter Befund war das Gen der MAP-Kinase 1, welches mit aggressiven NSCLC assoziiert ist, herunterreguliert. Einige dual spezifische Phosphatasen (DUSP) waren hochreguliert, andere jedoch herunterreguliert. Des Weiteren waren einzelne Gene wie die RAS-Proteinaktivatoren 1 und 4 oder die MYC-binding Proteine 1 und 2 ohne erkennbaren Zusammenhang herunter- bzw. hochreguliert. Die Rollen von DUSP, RASA1 und MYCBP im LC sind bislang nicht geklärt.

In der Gruppe der Wachstumfaktoren fiel zunächst eine geringe Expression des TGF-β-Rezeptors-2 auf, dessen Stimulation die MAP-Kinasenkette aktiviert, wohingegen andere Proteine der TGF-Familie wie TGF-α, TGF-ß oder der TGF-β-Rezeptor-III hochreguliert waren. Die Herunterregulation des TGFßR2 ist mit einer verminderten proapoptotischen Aktivität und erhöhten Metastasierungsfähigkeit im LC verbunden, während die Wiederherstellung vom TGFßR3 im Prostatakarzinom mit einer geringeren Zellmotilität und Invasionsfähigkeit verknüpft ist. Beide Befunde scheinen daher zunächst gegensätzlich, die TGFßR3-Hochregulation könnte dennoch der Herunterregulation des TGFR2 entgegenwirken.

Darüber hinaus waren weitere Wachstumsfaktoren wie das "Insulin-like" IGFBP 3 und 6 herunter-, andere wie die PDGF-A und C hoch reguliert. Auch der

vaskuloendotheliale Faktor VEGF-C aus der VEGF-Familie war mit einem FC von 1,564 zu betonen.

Beim Betrachten des Apoptose-Signalwegs fielen einzelne, nicht zusammenhängende Gene als differenziell exprimiert auf. Der proapoptotische "apoptotic peptidase activating"-Faktor APAF-1 war mit 1,614 am höchsten reguliert, seine Zielproteine, die Caspasen, jedoch weitgehend unauffällig. Zu den anderen Genen steht aktuell nicht genug Information zur Verfügung, um ihre Bedeutung zu verstehen. Das p53-Gen, das bei der Zelllinie H23 mutiert ist, war nicht betroffen. Insgesamt hat aber die PTTG1-Herunterregulation vermutlich keinen Effekt auf den Apoptose-Signalweg.

Die Wnt-Proteine steuern die Embryogenese und spielen eine Rolle in der Tumorgenese. Ihre Wirkung wird durch die Rezeptor-Familie Frizzled und das intrazytoplasmatische Protein &-Catenin erzielt. Im Wnt-Signalweg fiel jedoch lediglich die Hochregulation des Rezeptors Frizzled 6 auf. Jegliche Wnt-Proteine, andere Frizzled-Rezeptoren und das &-Catenin waren in ihrer Expression nicht beeinflusst. Die Rolle des Rezeptors Frizzled 6 in malignen Zellen ist jedoch bislang nicht geklärt. Unter seinen multiplen "downstream" Kaskaden zeigte sich eine Hochregulation verschiedener Phospholipasen-C, welche die intrazelluläre Kalzium-Konzentration steigern soll.

Zuletzt bewirkte die PTTG1-Ausschaltung einen Effekt in zahlreichen Zelladhäsionsmolekülen und Proteinen der extrazelullären Matrix. Beispielsweise zeigte sich eine Hochregulation des Kollagen Typ IV, welches die wichtigste Komponente der Basalmembran darstellt. Die vermehrte Expression der Matrix Metallopeptidase 2, welche das Kollagen IV verdaut, ist möglicherweise reaktiv auf die Hochregulation des Kollagen IV zurückzuführen.

Ein wichtiger Befund stellt die Herunterregulation der Integrine α 6 und ß4bp ("binding protein") dar. Diese bilden den Rezeptor für das Laminin 5, das aus den Untereinheiten α 3, ß3 und γ 2 besteht und dessen Expression und Stimulation seines Rezeptors mit einem metastasierenden NSCLC-Phänotyp verbunden ist. Obwohl die γ 2-Einheit des Laminins 5 leicht hochreguliert war, waren beide Integrine stark herabreguliert, so dass die Metastasierungsfähigkeit vermutlich vermindert wäre. Weitere Proteine wie Actinin und Actin, welche die Zellmotilität ermöglichen, waren nach PTTG1-Ausschaltung übereinstimmend herunterreguliert.

Drei Proteine der Fibronectin-Familie zeigten eine erhöhte Expression. Obwohl das Fibronectin unter anderem die Matrix Metallopeptidase 9 aktiviert und somit eine vermehrte Invasion der NSCLC-Krebszellen unterstützt, bleibt zu klären, ob die Typen 1, 3A und 3B auch dafür verantwortlich gemacht werden können.

Das Connexin 43 oder "gap junction protein" ist wichtig für die interzelluläre Kommunikation und die Gewebe-Homöostase. Sein Verlust führt zur verminderten Wachstumskontrolle und zu einem neoplastischen Phänotyp. Die Transfektion und Wiederherstellung dieses Gens zeigte bereits 1998 einen Tumor-hemmenden Effekt in LC-Zelllinien. Die Genexpressionsanalysen dieser Arbeit zeigten eine Hochregulation des Connexins 43 nach PTTG1-Ausschaltung.

Zusammenfassend werden zahlreiche Gene 72 h nach PTTG1-siRNA-Transfektion und –Ausschaltung betroffen. Dabei werden besonders Gene in ihrer Expression beeinflusst, die eine Rolle im Zellzyklus spielen sowie andere, die für Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsmoleküle bzw. extrazelluläre Matrix kodieren.

3.6 Funktionelle Effekte der PTTG1-Herunterregulation auf die Zellproliferation

3.6.1 Effekte auf die Zellzahl bei 24, 48 und 72 h nach Lipofektion

Zur Überprüfung, ob die Herunterregulation der Zellzyklusgene nach PTTG1-siRNA-Transfektion einen Einfluss auf die Vermehrung der Zellen hat, wurden funktionelle Experimente mittels Zellkultur und Trypanblauexklusionsmethode durchgeführt. 24, 48 und 72 h nach Lipofektion mit PTTG1-siRNAs wurde die absolute Zellzahl der lebenden Zellen bestimmt.

Initial wurde die Zelllinie H1299 mit 10 nM siRNA in einem doppelten Ansatz getestet. Dabei wurden das PTTG1-siRNA-Molekül 41990 sowie die Kontroll-siRNA CT41990 verwendet (Abb.29).



Lipofektion H1299 mit 10nM siRNA

Abb. 29: Lipofektion der Zellinie H1299. Absolute Zellzahl 24, 48 und 72 h nach Lipofektion mit 10 nM CT41990 und PTTG1-siRNA 41990. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Experimenten. Der Unterschied in der Zellzahl zwischen unbehandelter und MOCK-Kontrolle, MOCK-Kontrolle und CT41990 sowie CT41990 und PTTG1-siRNA 41990 waren nicht signifikant (respektiv p=0,12; p=0,09; p=0,15). Der Unterschied zwischen MOCK-Kontrolle und PTTG1-siRNA 41990 war mit einem p-Wert von 0,024 (*) signifikant.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Zellzahl der verschiedenen Ansätze 72 h nach Lipofektion beobachtet werden. So lag die Zahl der unbehandelten Kontrollen bei etwa 650.000 Zellen/ml, bei 550.000/ml für die MOCK-Kontrolle und bei 400.000/ml für die siRNA-Proben. Weder der Unterschied zwischen unbehandelten und MOCK-Proben noch zwischen MOCK und Kontroll-siRNA war signifikant (respektiv p=0,12 und p=0,09). Obwohl der Unterschied zwischen MOCK-Kontrolle und PTTG1-siRNA 41990 signifikant war (*p=0,024), hatte dieser nichts zu bedeuten, da die PTTG1-siRNA 41990 und deren siRNA-Kontrolle CT41990 sich voneinander nicht signifikant unterschieden (p=0,15), so dass man hier von einer unspezifischen Hemmung der Zellproliferation, am ehestens toxisch, ausgehen muss.

Die Lipofektion der Adenokarzinom-Zelllinie H23 wurde insgesamt elfmal wiederholt (Abb. 30). Ähnlich wie bei der Zelllinie H1299 zeigten sich hier keine Unterschiede (p=0,10 bis 0,48) zwischen unbehandelten, MOCK-Kontrollen und beiden siRNA-Proben. Auch zwischen PTTG1-siRNA-41990 und deren Kontrolle

CT41990 zeigte sich kein signifikanter Unterschied (p=0,26), so dass sich auch hier kein spezifischer funktioneller Effekt der PTTG1-siRNA-Sequenz auf die Zellproliferation zeigte.



Lipofektion H23 mit 10nM siRNA

Abb. 30: Lipofektion der Zellinie H23. Absolute Zellzahl 24, 48 und 72 h nach Lipofektion mit 10 nM PTTG1-siRNA 41990 und CT41990. Die Ergebnisse nach 72 h entsprechen dem Mittelwert aus elf Experimenten. Die Standardabweichungen sind zwecks Übersichtlichkeit ausgeblendet. Die Unterschiede zwischen den vier Proben waren nicht signifikant (p=0,10 bis 0,48)

Zuletzt wurde die Plattenepithelkarzinom-Zelllinie H157 funktionell mit der PTTG1-siRNA-Transfektion getestet. Insgesamt wurde diese Zelllinie viermal lipofiziert, die Zellzahl der verschiedenen Proben wurde nach 72 h bestimmt (Abb. 31). Die H157 wuchs langsamer als die H1299 und H23. So betrug die Zellzahl für alle Proben 72 h nach Lipofektion zwischen 190.000 und 223.000/ml. Die Unterschiede zwischen unbehandelten, MOCK-Kontroll- sowie den siRNA-Proben CT41990 und PTTG1-41990 waren nicht signifikant (p=0,16 bis 0,38). Die Standardabweichungen sind hier ebenfalls zwecks Übersichtlichkeit nicht dargestellt.



Lipofektion H157 mit 10nM siRNA

Abb. 31: Lipofektion der Zellinie H157. Absolute Zellzahl 24, 48 und 72 h nach Lipofektion mit 10 nM PTTG1-siRNA 41990 und CT41990. Gezeigt werden die Mittelwerte aus vier Experimenten. Die Standardabweichungen sind zwecks Übersichtlichkeit ausgeblendet. Die Unterschiede zwischen den vier Proben waren nicht signifikant (p=0,16 bis 0,38)

Zusammenfassend waren keine signifikanten Unterschiede in der Zellzahl 24, 48 oder 72 h nach Lipofektion mit PTTG1-siRNA zwischen den verschiedenen Proben und Zelllinien zu beobachten. Daher scheint die PTTG1-Transfektion und Ausschaltung zumindest keinen kurzfristigen Effekt auf das Wachstum dieser Zelllinien zu haben.

3.6.2 "Clonogenic Assay"

Zur Überprüfung des Effekts in der langfristigen Zellkultur nach PTTG1-Gen-Ausschaltung wurden "clonogenic assays" der Zelllinie H23 durchgeführt. Es wurden 500 vitale Zellen 72 h nach Lipofektion ausgesät und in neuen Kulturflaschen für weitere 7 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien mit mindestens 50 Zellen gezählt. Abb. 32 zeigt den Mittelwert aus vier Experimenten. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede (p=0,27 bis 0,47) zwischen den Kolonienzahlen der unbehandelten und MOCK-Kontrollen sowie der beiden siRNA-Proben in vier unabhängigen Experimenten.



Clonogenic Assay der Zelllinie H23

Abb. 32: "Clonogenic Assay" der Zelllinie H23. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier Experimenten. Die Zahl der Kolonien war nicht signifikant unterschiedlich (p=0,27 bis 0,47) zwischen den vier Proben sieben Tage nach Lipofektion.

Daraus lässt sich schließen, dass sich die Teilungsfähigkeit der Zelllinie H23 weder kurzfristig noch sieben Tage nach Transfektion mit PTTG1-siRNA beeinträchtigen lässt.

4. DISKUSSION

Die Lungenkarzinome sind die häufigste tumorassoziierte Todesursache bei Männern und mit steigender Tendenz die dritthäufigste bei Frauen. Die Erforschung dieser Erkrankung stellt daher eine Herausforderung für die Wissenschaft dar. Die Fortschritte der zielgerichteten und antiangiogenetischen Therapie haben in den letzten Jahren eine bessere Prognose mit Verlängerung der Überlebenszeit für Patienten mit Lungenkarzinom ermöglicht. Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit fortgeschrittenem LC beträgt dennoch nur 5%, so dass weitere Erkenntnisse über die Pathogenese dieser Erkrankung dringend notwendig sind¹⁻³.

Zahlreiche Publikationen seit etwa zehn Jahren unterstützen die These, dass das Onkogen PTTG1 eine wichtige Rolle in der Genese aber auch im lokalen Progress und in der Metastasierung verschiedenster Tumoren wie beispielsweise der Hypophyse, des Gastrointestinaltrakts oder der Niere spielt. Das tumoröse Gewebe zeigte gegenüber gesundem Gewebe eine PTTG1-Überexpression, welche teilweise mit einer schlechteren Prognose verbunden war⁵⁰⁻⁵⁹.

Die Onkogenität dieses Gens wurde in vivo mit der Injektion von PTTG1transfizierten Fibroblasten in Mäusen durch die Entstehung von Tumoren an der Injektionsstelle bestätigt^{45;60}. Das PTTG1 spielt nicht nur eine Rolle in der Tumorgenese. Auch seine Beteiligung an der Angiogenese ist nachgewiesen worden. Die Transfektion von PTTG1 in Fibroblasten induzierte einen bFGF, proangiogenetischen Phänotyp durch Stimulation vom welches möglicherweise für die Tumorprogression und –metastasierung verantwortlich ist⁶¹⁻⁶⁴.

Eine PTTG1-Überexpression im LC wurde erst 2003 von Honda et al. nachgewiesen und mit der Tumorgenese und -progression verbunden³⁶. Unsere Arbeitsgruppe konnte dies mittels immunhistochemischen Färbungen bestätigen und eine PTTG1-Expression bei 64% der SCLC und 97,8% der NSCLC zeigen. Interessanterweise konnten wir dabei feststellen, dass diese Überexpression mit einer schlechteren Prognose beim NSCLC, jedoch mit einer besseren Prognose beim SCLC verknüpft ist⁶⁹. Ferner konnte durch weitere Untersuchungen gezeigt werden, dass die Biopsate aus Patienten mit Adenokarzinom die höchste PTTG1-Überexpression aller NSCLC aufweisen (unpublizierte Daten).

Dem PTTG1 sind insgesamt viele onkogene Eigenschaften zugesprochen worden. Dies liegt möglicherweise daran, dass das PTTG1 eine entscheidende Rolle in der Zellzyklusregulation spielt, wo es als mitotischer "Checkpoint" funktioniert und für die Euploidie der Zelle sorgt. Die Verdauung des PTTG1-Proteins am Ende der Metaphase durch den "anaphase promoting complex" ermöglicht die Separation und Wanderung der Chromatiden in die Zellpole durch das Protein Separin, das bis dahin von dem PTTG1 gehemmt ist³⁵⁻³⁹. Hieraus leitet sich ab, dass eine PTTG1-Überexpression die Funktion des Separins behindert und damit zur Aneuploidie der Zellen führen kann⁴⁰⁻⁴³.

Zwei weitere Gene, PTTG2 und PTTG3, bilden mit dem PTTG1 die PTTG-Familie. Die Funktion dieser beiden Gene ist noch unbekannt. Obwohl die hohe Konzentration an PTTG-Protein in vielen Krebszelllinien auf eine PTTG1-Überexpression zurückzuführen ist, wird eine Rolle dieser beiden Gene in der Tumorpathogenese vermutet^{33;34}.

In dieser Arbeit wurde erstmals der funktionelle Effekt einer PTTG1-Herunterregulation in Lungenkarzinom-Zelllinien untersucht. Wir konnten zeigen, dass die Ausschaltung des PTTG1 zu transkriptionellen Veränderungen von Zellzyklus-, Apoptose- und Migrationsassoziierten Genen führt.

4.1 Zur Transfektion

Mit dem Ziel, die Rolle des PTTG1 in NSCLC funktionell zu untersuchen, versuchten wir, die PTTG1-Überexpression in NSCLC-Zelllinien auszuschalten. Dazu eignete sich die Technologie der RNA-Interferenz. Träger des Nobelpreises für Medizin 2006, Fire and Mellow, beschrieben 1998 eine spezifische mRNA-Degradation mittels dsRNA-Einschleusung in Zellen⁶⁹. Äquivalent dazu führte die Transfektion von 21 Nukleotiden großen RNAs, sog. siRNAs, ebenfalls zur spezifischen mRNA-Degradation⁷⁰⁻⁷¹. Die Einschleusung oder Transfektion der siRNAs in Zellen kann durch physikalische, chemische oder virale Methoden erfolgen.

Für die PTTG1-Ausschaltung wurden spezifische, gegen die PTTG1-mRNA gerichtete siRNA-Sequenzen der Firma Ambion[®] verwendet. Es boten sich drei Sequenzen an, die PTTG1-siRNA 41900 und 41990, die gegen das dritte PTTG1-

mRNA-Exon gerichtet waren, und die PTTG1-siRNA 42068 gegen das sechste PTTG1-mRNA-Exon. Alle drei siRNA-Moleküle zeigten beim Vergleich ihrer Sequenzen mit der PTTG1-mRNA-Sequenz mittels dem "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) eine 100%ige Übereinstimmung der komplementären Sequenzen. Eine Übereinstimmung mit der PTTG2-, PTTG3-mRNA oder mit anderen Transkripten des humanen Genoms fand sich nicht, und das obwohl das PTTG2 zu 91% und das PTTG3 zu 89% identisch zu PTTG1 sind³⁵. Hier ist davon auszugehen, dass die drei PTTG1-siRNA-Moleküle spezifisch gegen lediglich die PTTG1-mRNA gerichtet sind. Die Sequenzen der von uns hergestellten Kontroll-siRNAs zeigten ebenfalls keine Homologien zu menschlichen Genen.

Als NSCLC-Zelllinien dienten die nicht-kleinzellige Lungenkarzinom-Zelllinie H1299, die Adenokarzinom-Zelllinie H23 und die Plattenepithelkarzinom-Zelllinie H157. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde zunächst aufgrund der guten Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe mit CML-Zelllinien die physikalische Transfektion mit dem Amaxa[®]-Nukleofektor gestestet. Zur Beurteilung der Transfektionstauglichkeit wurde das Verfahren auf Viabilität und Effizienz 24, 48 und 72 h nach Transfektion untersucht. Für die Nukleofektion wurden die von der Firma für die Lungenkarzinom-Zelllinien empfohlenen Nukleofektionsprogramme P20, T20 und T14 verwendet. Hierbei zeigten sich beispielsweise Viabilitätsergebnisse nach 48 h, die zwischen 25% und 55% variierten sowie Nukleofektionseffizienzen zwischen 45% und 65% für die NSCLC-Zelllinie H1299. Diese Ergebnisse sprachen für eine zu hohe Toxizität dieser Methode und wurden von uns als unzureichend für die weiteren Untersuchungen von NSCLC-Zelllinien bewertet.

Daher wurde anschließend die chemische Transfektion mit einem Lipofektionsreagenz (HiPerFect[®]) getestet. Die Lipofektionsviabilität lag mit 85% für die Zelllinie H1299, 75% für die Adenokarzinom-Zelllinie H23 und 91% für die Plattenepithelkarzinom-Zelllinie H157 deutlich über der der Nukleofektion. Darüber hinaus war die Lipofektionseffizienz mit Werten über 90% besser als bei der Nukleofektion, so dass sich die Lipofektion als ein geeignetes Transfektionsverfahren für NSCLC-Zelllinien erwies. Das Verwenden größerer Lipofektionsreagenz-konzentrationen (3 oder 4,5 μ I) zeigte ähnliche Toxizitätsergebnisse und vergleichbare Effizienz.

Wir konnten anhand dieser Experimente die Lipofektion als ein wenig toxisches, sehr effektives Verfahren für die Transfektion von siRNAs in NSCLC-Zelllinien etablieren.

Zur Bestimmung des Ausmaßes der PTTG1-Ausschaltung nach effektiver PTTG1-siRNA-Transfektion wurden "real time" RT-PCRs durchgeführt. Dabei wurde die Konzentration an PTTG1-mRNA des Zelllysates 24, 48 und 72 h nach Lipofektion bestimmt. So zeigte sich für alle drei Zelllinien die niedrigste PTTG1-mRNA-Expression 72 h nach Lipofektion mit der siRNA-Sequenz 41990. Die relative PTTG1-mRNA-Konzentration betrug nur noch etwa 3% für die Zelllinie H1299, 5% für die H23 und ca. 40% für die H157 im Vergleich zur unbehandelten oder MOCK-Kontrolle. Das entsprechende Kontroll-siRNA-Molekül CT41990 bewirkte keinen signifikanten Effekt auf die PTTG1-mRNA-Konzentration.

Die PTTG1-Ausschaltung wurde auch auf Proteinebene bei der Adenokarzinom-Zelllinie H23 mittels Western-Blot untersucht. Hierbei zeigte sich ein komplettes Verschwinden der PTTG1-Banden auf der Entwicklungsmembran.

Insgesamt konnten wird durch die Lipofektion von PTTG1-siRNA 41990 eine für das PTTG1-Gen nahezu komplett herunterregulierte Adenokarzinom-Zelllinie innerhalb 72 h erzeugen. Mit dieser etablierten Transfektionsmethode können zukünftig auch andere hochexprimierte Gene im Lungenkarzinom untersucht werden.

4.2 Zu den transkriptionellen Effekten der PTTG1-Herunter-

regulation in der Zelllinie H23

Da die Biopsate aus primären Adenokarzinomen die höchste PTTG1-Überexpression aller NSCLC aufwiesen, untersuchten wir die PTTG1-Herunterregulation in der Lungenadenokarzinom-Zelllinie H23. Hier waren die stärksten transkriptionellen Effekte unter den NSCLC-Zelllinien zu erwarten.

Wir verwendeten GeneChip[®] Arrays HG U133A 2.0, welche 22.000 "probe sets" mit 18.400 Transkripten und Varianten sowie 14.500 charakterisierte menschliche Gene erfassten. Davon fielen nach Auswertung der Mikroarrays mittels "Significance Analysis of Microarrays" (SAM) und nach Beschränkung der

statistischen Signifikanz auf p<0,05 und q-Wert <5% 79 Gene auf, die differenziell exprimiert waren und in sechs funktionelle Gruppen eingeteilt wurden.

Das PTTG1 und das Gen des Enzyms Dicer zeigten die größte Veränderung der Expression aller Gene, wobei PTTG1 erwartungsgemäß herunterreguliert und Dicer hochreguliert war. Dicer ist ein Enzym, das während des RNAi-Prozesses aktiviert wird. Diese Ergebnisse zeigten, dass das Experiment technisch korrekt durchgeführt wurde und dass siRNA-induzierte transkriptionelle Veränderungen zuverlässig mit der Mikroarray-Technik gemessen werden können.

Die Ergebnisse, die in den folgenden Seiten diskutiert werden, sind in der Abb. 33 schematisch dargestellt:



Abb. 33: Differentielle Expression unterschiedlicher Gene nach PTTG1-Herunterregulation durch PTTG1-siRNA-Transfektion. Gen-Abkürzungen sind in Tabelle 2 (S. 70+71) aufgeführt. Hoch- und herunterregulierte Gene werden rot bzw. blau dargestellt. Grau bedeutet keine differentielle Expression.

Interessanterweise waren auch die anderen Mitglieder der PTTG-Familie herabreguliert. Geht man davon aus, dass das siRNA-Molekül 41990 spezifisch gegen die PTTG1-mRNA gerichtet ist, so ist hier an eine Koregulation der PTTG-Familie zu denken, und zwar führt eine PTTG1-Ausschaltung zu einer Herunterregulation des PTTG2 und weitgehend des PTTG3. Dies verstärkt die Notwendigkeit, die physio- und pathophysiologische Rolle von PTTG2 und -3 in der Tumorgenese sowie die Beziehungen innerhalb der PTTG-Familie zu klären.

4.2.1 Zellzyklus

Am stärksten betroffen von der PTTG1-Herunterregulation war der Zellzyklus. Hier zeigten sich Änderungen in der Expression einer Vielzahl von Genen. So waren beispielsweise die Zellzyklus-aktivierenden Zyklin-abhängigen Kinasen CDK2, CDK4 und CDK6 herunterreguliert, die CDK-Inhibitoren 2A (p16), 2C (p18) und 1A (p21) stark hochreguliert. Interessanterweise waren die Zykline D, E und A in ihrer Expression nicht beeinträchtigt. Die Expression des Retinoblastom-Tumorsuppressorgens, welches am häufigsten beim SCLC mutiert ist^{21,76}, änderte sich hier ebenfalls nicht. Diese Befunde sind besonders unter Berücksichtigung der Literatur von wichtiger Bedeutung, denn in etwa 40% der Fälle sind die Zellzyklus-Komponenten p16, Zyklin D1 und CDK4 beim NSCLC mutiert, was zu einem führt^{20;21}. Zellwachstum Die unkontrollierten Herunterregulation der Zellzykluspromotoren CDK2, 4 und 6 sowie die Hochregulation mancher -Inhibitoren wie p16, p18 und p21 durch PTTG1-siRNAs könnte zur Bremse des Zellzyklus beitragen⁷⁷, was zur Tumorregression führen kann⁷⁸.

Weitere Gene, die für die Erhaltung der Chromosomen während der Mitose sorgen, wie das MCM ("mini-chromosome maintenance complex") und das SMC (structural maintenance of chromosomes 1) sowie das CHEK1 ("Checkpoint 1" der G2-Phase), waren herunterreguliert.

Insgesamt fielen ca. zehn Gene auf, die nach PTTG1-Herunterregulation übereinstimmend für eine verminderte Zellzyklusaktivität sprechen und zum Zellzyklusstopp führen könnten. Dies lässt vermuten, dass ohne PTTG1-Protein der Zellzyklus nicht fortschreiten kann und die Zellen in ihrer Proliferationsfähigkeit beeinträchtigt werden.

4.2.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg

Der MAPK/ERK-Signalweg setzt sich aus zahlreichen Mitogen-aktivierten Proteinkinasen zusammen und ist unter anderem für die Proliferation und Differenzierung der Zelle sowie für Entzündungsprozesse verantwortlich. Er ist mit wichtigen Signalwegen wie der Apoptose und mit dem Zellzyklus verknüpft. Eine Aktivitätsvermehrung der MAP-Kinasen korreliert in der Regel mit dem malignen Phänotyp verschiedener Tumoren.

Wir konnten eine signifikante Herunterregulation des MAP-Kinase 1 (MAPK1, ERK1)-Gens nach PTTG1-Ausschaltung nachweisen, was einen interessanten Befund darstellt, zumal die MAPK1-Aktivität mit fortgeschrittenen und aggressiven NSCLCs assoziiert wird^{45;79;80}.

Weitere wichtige MAPK-Proteine sind die sog. "dual specificity phosphatase" oder MAPK-Phosphatasen (DUSP oder MKP), welche verschiedene Substrate dephosphorylieren. Die Mikroarrayanalyse erbrachte zwei herab- und drei hochregulierte DUSP-Gene. Beispielsweise war das DUSP1, welches als potenzieller positiver Prognosefaktor erkannt wurde, mit einem "Fold Change" von 0,8 leicht herabreguliert.

Ein weiteres wichtiges Protein des MAPK-Signalwegs ist das RAS-Onkogen. Sämtliche Varianten dieses Gens wie das K-RAS oder H-RAS zeigten keine signifikante differentielle Expression. Das RAS p21 "protein activator" RASA1, dessen Mutation Malformationen der Blutgefäße verursacht⁸¹, war jedoch stark herabreguliert.

Das MYC ist auch ein anerkanntes Onkogen, welches vom MAPK phosphoryliert wird und an der Tumorgenese verschiedener Krebsarten wie z.B. dem Mammakarzinom beteiligt ist⁸². Das MYC-Gen war nicht signifikant differentiell exprimiert, eine Hochregulation des MYC-"binding protein" 1 und 2 in den Mikroarrays war jedoch auffällig.

Die Rollen von DUSP, RASA1 und MYCBP im LC sind bislang nicht geklärt. Obwohl die drei Gene zum gleichen Signalweg gehören, waren diese Gene in unterschiedlichen Richtungen dereguliert. Deshalb fällt es hier schwer, ohne weitere Untersuchungen Rückschlüsse auf die Bedeutung ihrer differentiellen Expression nach PTTG1-Ausschaltung zu ziehen. Die starke Herunterregulation des MAPK1 und

RASA1 sind zumindest im Kontext der bisher im Zellzyklus erhobenen Befunde positiv zu bewerten.

4.2.3 Apoptose

In der funktionellen Gruppe der Apoptose fand sich nach PTTG1-Herunterregulation eine vermehrte Expression der proapoptotischen Gene APAF1 und GADD45B-Gens ("Growth Arrest und DNA-Damage"), welches seine Eigenschaften als Antwort auf DNA-Schäden entfaltet und in hepatozelullären Karzinomen hypermethyliert wird⁸³.

Einige Mitglieder der "Tumor Necrosis Factor" TNF-Rezeptoren-Superfamilie wie dem 1A, 6B, 10B und 21 waren differenziell exprimiert. So waren die 1A, 10B und 21 hochreguliert, während das 6B herabreguliert war. Da insgesamt vier Mitglieder betroffen waren, spricht dies gegen einen Zufallsbefund. Interessanterweise waren nur die Rezeptoren und nicht die Faktoren selbst betroffen.

Weitere Untersuchungen sind hier notwendig, zumal der aktuelle Literaturstand keine Information zur Rolle dieser Rezeptoren-Superfamilie im LC liefert. Apoptose-Tests sind notwendig, um zu überprüfen, ob die Hochregulation des APAF1, GADD45B und der drei TNF-Rezeptoren eine vermehrte apoptotische Aktivität nach PTTG1-Herabregulation induziert. Die intranukleäre Lokalisation des APAF1 ist bereits mit einer besseren Prognose beim NSCLC verknüpft worden⁸⁴⁻⁸⁶.

Das Gen p53 zeigte keine differenzielle Expression nach PTTG1-Ausschaltung. Zu vermerken ist, dass die Zelllinie H23 eine Mutation dieses Gens im Codon 246 (ATC \rightarrow ATG, Isoleucin \rightarrow Methionin) besitzt. Daher scheint es hier nicht sinnvoll, Aussagen über die Beziehung des PTTG1 zum p53-Gen ohne weitere Untersuchungen zu treffen.

Zur Überprüfung, ob die verminderte Zellzyklusaktivität und die durch Hochregulation von APAF1 und GADD45B eventuell aktivierte Apoptose einen Effekt auf das Zellwachstum und –proliferation hatten, wurden funktionelle Experimente durchgeführt. Zu erwarten war eine signifikant kleinere Zellzahl in der mit PTTG1siRNA transfizierten Probe durch weniger Wachstum und vermehrte Apoptose.

Die drei NSCLC-Zelllinien H23, H1299 und H157 wurden entweder mit der Kontroll-Sequenz CT41990 oder mit der PTTG1-siRNA 41990 transfiziert. Als Kontrolle dienten eine unbehandelte und eine MOCK-Kontrolle. Die absolute Zellzahl

wurde 24, 48 und 72 h nach Lipofektion mit der Trypanblau-Exklusionsmethode ermittelt. Wie die Abb. 27, 28 und 29 zeigen, war kein signifikanter zeitabhängiger Unterschied in der Zellzahl zu beobachten.

Das Experiment wurde auch als Langzeitkultur oder "Colony Assay" mit der Adenokarzinom-Zelllinie H23 getestet, um das klonogene Wachstum der Zellen zu überprüfen. 500 Zellen jedes Ansatzes wurden 72 h nach Lipofektion ausgesät und nach sieben Tagen die Kolonien mit mehr als 50 Zellen gezählt. Auch hier war kein signifikanter Unterschied zu ermitteln. Sowohl die unbehandelten als auch die MOCK-, Kontroll-siRNA- und PTTG1-Proben wiesen einen Mittelwert von etwa 150 Kolonien auf.

Die Ergebnisse der Mikroarrays waren jedoch so eindeutig, dass wir das Fehlen eines Effektes in der Zellproliferation auf die Zelllinie zurückführten. Daher führten wir eine histologische und zytogenetische Untersuchung der H23-Zellen durch, deren Ergebnisse den fehlenden funktionellen Effekt erklären könnten. Hier wird in 4.3 genauer eingegangen.

4.2.4 Wachstumsfaktoren

Die vierte funktionelle Gruppe betraf die Wachstumsfaktoren. Hier zeigten zahlreiche Faktoren und Rezeptoren wie der TGFα, TGFß2, TGFßR2 und 3, IGFBP3 und 6, PDGFα, PDGFC, Thrombospondin 1 oder VEGFC eine differenzielle Expression.

In der "Transforming Growth Factor" (TGF)-Familie zeigte sich eine Hochregulation des TGFα, -ß2 und –ßR3 sowie eine Herabregulation des TGFßR2 nach Hemmung der PTTG1-Expression. Die TGFß-Familie reguliert unter anderem die Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose der Zelle sowie die Ablagerung der extrazellulären Matrix mit insgesamt antitumoröser Wirkung. Diese Wirkung kann jedoch beispielsweise durch Verlust des TGFß-Rezeptor 2 in LC⁸⁷ oder des TGFß-Rezeptor 3 in Prostatakarzinomen abgeschaltet werden. So wurde die Herunterregulation des TGFß-Rezeptor 2-Signalweges mit einer erhöhten Metastasierungsfähigkeit verbunden⁸⁸, wohingegen die Wiederherstellung dieses Rezeptors in der Lungenadenokarzinom-Zelllinie VMRC-LCD eine erhöhte Apoptose-Aktivität⁸⁹ und im Prostatakarzinom⁹⁰ eine geringere Zellmotilität und – invasionsfähigkeit zeigte.

Während die Faktoren TGF α und TGF β 2 sowie der TGF β -Rezeptor 3 stark hochreguliert waren, war der TGF β -Rezeptor 2 nach PTTG1-Ausschaltung herabreguliert. Die Herunterregulation des TGF β R2, welches als Tumorsupressorgen funktioniert, und die Hochregulation des TGF α , der Proliferation und Migration favorisiert, sind hier von ungünstiger Bedeutung. Dahingegen ist die Hochregulation des TGF β R3 positiv zu betrachten. Die Rolle dieser Familie ist jedoch im LC bislang zu wenig erforscht worden, um hier Rückschlüsse machen zu können.

Wachstumsfaktoren-Gruppe Ein weiterer Befund in der war die Herunterregulation des IGFBP 3 und 6 und die Hochregulation des IGF2-Rezeptors. begünstigt das Tumorwachstum mittels Aktivierung Die **IGF-Familie** der Zellproliferation- und Antiapoptose-Signalwege^{91;92}. Dem IGF-, binding protein" 3 sind antiangiogenetische Eigenschaften zugesprochen⁹³, wobei die Arbeitsgruppe von Ahn et al. keinen Zusammenhang zwischen IGFBP-3 und dem Lungenkarzinom fand⁹⁴.

Andere einzelne, hochregulierte Wachstumsfaktoren waren PDGFα, PDGFC, Thrombospondin 1 und VEGFC. Letzterer scheint eine Rolle in der lymphatischen Metastasierung des NSCLC zu spielen⁹⁵. Betrachtet man diese abweichenden Ergebnisse, so würde die Abschaltung des PTTG1-Onkogens einen malignen, zum Teil proangiogenetischen Phänotyp mittels TGFß-Receptor 2- und IGFBP-3-Herunterregulation sowie Hochregulation anderer Wachstumsfaktoren wie VEGFC favorisieren. Dies benötigt weitere klärende Untersuchungen, zumal diese Gruppe sehr groß und inhomogen ist. In der Behandlung der NSCLCs hat das Verwenden eines VEGF-Antikörpers, dem Bevacizumab, einen Überlebensvorteil von etwa zwei Monaten in Kombination mit Chemotherapie im Vergleich zu Patienten, die nur Chemotherapie erhielten²⁸, so dass die Forschung im Gebiet der Wachstumsfaktoren unbedingt notwendig ist.

4.2.5 WNT-Kalzium

Die Wnt-Proteine, deren Funktion initial in der Embryogenese erkannt wurde, spielen auch eine Rolle in der Tumorgenese⁹⁶. Ihre Kopplung an die Rezeptor-Familie Frizzled aktiviert einen Signalweg, der das intrazytoplasmatische Protein ß-Catenin beeinflusst. Im Wnt-Signalweg fiel nach PTTG1-Ausschaltung lediglich die

Hochregulation des Rezeptors Frizzled 6 auf. Jegliche Wnt-Proteine, andere Frizzled-Rezeptoren und das ß-Catenin waren in ihre Expression nicht beeinflusst. Die Rolle des Rezeptors Frizzled 6 bei maligner Entartung ist bislang nicht geklärt. Unter seinen multiplen "downstream" Kaskaden zeigte sich eine Hochregulation verschiedener Phospholipasen-C, welche die intrazelluläre Kalzium-Konzentration regulieren, so dass diese nach PTTG1-Herunterregulation möglicherweise ansteigt.

4.2.6 Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrix

Die PTTG1-Ausschaltung bewirkte auch einen Effekt in der Expression zahlreicher Zelladhäsionsmoleküle wie Integrinen und Connexin 43 sowie Proteinen der extrazellulären Matrix wie Kollagen Typ IV, Matrix Metallopeptidase 2 und Fibronectinen.

Insbesondere zeigte sich eine Hochregulation des Kollagens Typ IV α3. Das Kollagen IV stellt die wichtigste Komponente der Basalmembran dar. Die Hypermethylierung und Verlust der Subtypen α5 und α6 führt beim Kolorektalkarzinom zur vermehrten Zellauswanderung⁹⁷. Die Rolle des α3-Subtyps ist anhand des aktuellen Literaturstands nicht zu eruieren. Es lässt sich aber vermuten, dass eine vermehrte Kollagen IV-Expression an der Erhaltung der Basalmembran beteiligt ist und somit zur verminderten Metastasierungsfähigkeit beitragen kann. Die erhöhte Expression der Matrix Metallopeptidase 2, welche das Kollagen IV verdaut und die Zellauswanderung ermöglicht⁹⁸, ist möglicherweise reaktiv auf die Hochregulation des Kollagens IV zurückzuführen.

Die Herunterregulation der Integrine α 6 und ß4bp ("binding protein") stellt einen wichtigen Befund dieser Arbeit dar, da die Literatur genaue Angaben zur Beteiligung dieser Moleküle an der Metastasierung der NSCLCs bietet. Beide Integrine bilden den Rezeptor für das Laminin 5, das aus den Untereinheiten α 3, ß3 und γ 2 besteht. Die Laminin-Überexpression und Stimulation seines Rezeptors ist mit einem metastasierenden Phänotyp im NSCLC verbunden⁹⁹. Obwohl die γ 2-Einheit des Laminins 5 leicht hochreguliert war, waren beide Integrine stark herabreguliert.

Weitere Proteine wie Actinin α1 und α4 sowie einige des "actin related proteincomplex" (ARP), welche die Zellmotilität ermöglichen, waren nach PTTG1-Ausschaltung übereinstimmend herunterreguliert. Interessanterweise war das Duo

ARP 2 und WASF 2, welches in pulmonalen Adenokarzinomen koexprimiert wird¹⁰⁰, signifikant herunterreguliert, so dass hier insgesamt eine verminderte Migrationsfähigkeit der Zellen nach PTTG1-Ausschaltung zu erwarten ist.

Passend dazu war das Connexin oder "gap junction protein" 43 nach PTTG1-Ausschaltung 1,4-fach hochreguliert. Dieses Protein ist wichtig für die interzelluläre Kommunikation und Gewebe-Homöostase. Sein Verlust führt zur verminderten Wachstumskontrolle und einem neoplastischen Phänotyp. Transfektion und Wiederherstellung dieses Gens zeigten bereits 1998 einen Tumor-hemmenden Effekt in LC-Zelllinien¹⁰¹⁻¹⁰⁴.

Drei Proteine der Fibronectin-Familie (Typ 1, 3A und 3B) zeigten eine erhöhte Expression. Weil das Fibronectin durch verschiedene Wege wie z.B. die Matrix Metallopeptidase 9-Aktivierung eine vermehrte Invasion der NSCLC-Krebszellen anregt^{105;106}, bleibt zu klären, ob die drei hochregulierten Fibronectinsubtypen auch einen solchen Effekt haben könnten.

Zusammenfassend wurden 79 Gene 72 h nach PTTG1-siRNA-Transfektion und –Ausschaltung auffällig. Dabei wurden in ihrer Expression insbesondere Gene des Zellzyklus, der Apoptose, der Wachstumsfaktoren und der Zelladhäsionsmoleküle bzw. Proteine der extrazellulären Matrix beeinflusst. Diese sprechen für eine verminderte Zellzyklusaktivität und Migrationsfähigkeit sowie eine vermehrte Apoptose, was dem PTTG1-Onkogen neue, positive Eigenschaften als therapeutisches Ziel verleiht.

4.3 Zur Lungenadenokarzinom-Zelllinie H23

Die Ergebnisse der funktionellen Analysen erfüllten nicht die Erwartungen, die die Genexpressionsanalysen geweckt hatten. Bei der Suche nach Erklärungen, warum sich kein Zusammenhang zwischen transkriptionellen und funktionellen Effekten ergeben hatte, wurde eine pathologische und eine zytogenetische Untersuchung der Zelllinie H23 durchgeführt (siehe 2.1.1). Immunzytochemisch zeigte sich eine Hämatoxillin-Eosin positive Karzinom-Zelllinie mit positiver Reaktion für Panzytokeratin und Zytokeratin (CK) 8, was für ein Adenokarzinom sprach. Weitere klassische Adenokarzinom-Färbungen wie das CK7, TTF-1, CEA und CA19-9 waren

negativ. Ferner fiel eine starke Positivität für den Proliferationsmarker Ki67 oder Mib1 auf. Zytogenetisch fand sich ein "near" tetraploider, komplex veränderter Chromosomensatz. Die aufgestellte Chromosomenformel stellte einen "composite" Karyotyp dar.

Zusammengefasst arbeiteten wir mit einer Lungenadenokarzinom-Zelllinie mit einer sehr hohen Proliferationsrate, die trotz transkriptioneller Veränderung von Zellzyklus- und Apoptosegenen in ihrer Proliferation nicht beeinflusst werden konnte. Möglicherweise verwendete sie dafür andere kompensatorische Signalkaskaden, oder die Proteinexpression war trotz Genherunterregulation unverändert. Betrachtet man die zytogenetische Untersuchung, so handelt es sich um eine durch die notwendigen, multiplen Passagen komplex mutierte Zelllinie. Diese Tatsachen können die Erklärung dafür sein, dass sich die transkriptionellen Ergebnisse funktionell nicht widerspiegelten. Dennoch sind die transkriptionellen Effekte vermutlich nicht zufällig. So sind ganze funktionelle Gruppen einheitlich durch das PTTG1 "knock-down" verändert. Außerdem verwendeten wir bei der statistischen Analyse eine Permutationstestung mit Bestimmung einer "false discovery rate", ein Verfahren, das das Risiko für die zufällige Identifikation von signifikanten Genen reduziert.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die nahezu komplette Herunterregulation des Gens PTTG1 in der NSCLC-Zelllinie H23 führte zu transkriptionellen Veränderungen, die mittels Mikroarray-Technologie erfasst werden konnten. Dadurch bewirkte die PTTG1-Herunterregulation eine differentielle Expression von Genen, die an Zellzyklus, Apoptose und am MAPK-Signalweg beteiligt sind sowie von Genen, die für die extrazelluläre Matrix, für Adhäsionsmoleküle und für Wachstumsfaktoren kodieren. Insgesamt zeigen diese Veränderungen, dass die PTTG1-Ausschaltung das Potenzial hat, den Zellzyklus zu stoppen, die Apoptose zu aktivieren und die Migrationsfähigkeit zu vermindern.

Noch bedeutender ist die Tatsache, dass diese Methode die Möglichkeit eröffnet, auch andere Gene in Lungenkarzinom-Zelllinien zu untersuchen, für die entsprechende siRNAs auf dem Markt vorhanden sind. Dies ist besonders interessant für die Gene mit der höchsten Expression. Denn die Rolle der

Hochregulation eines Gens in einem bestimmen Tumor kann nach Ausschaltung dieses Gens durch funktionelle Experimente beleuchtet werden.

Sicherlich sind nach dieser Arbeit weitere funktionelle Experimente notwendig, beispielsweise Zellzyklusanalyse, Migrationsassays mit Matrigel[®], Apoptose-Tests sowie Messung der intrazellulären Kalzium-Konzentration, um die Konsequenzen der PTTG1-Ausschaltung weiter zu überprüfen. Die funktionellen Ergebnisse dieser Arbeit mit der Adenokarzinom-Zelllinie schließen einen verwertbaren Effekt wie verminderte Proliferation in primären Tumoren nicht aus. Besonders wichtig scheint hier dennoch eine Entscheidung zwischen einer Arbeit mit etablierten Zelllinien, oder "in vivo"-Experimenten mit Zellen aus primären Tumoren. Auch Tiermodelle können die Realität besser widerspiegeln.

Bestätigen sich die wichtigsten Punkte dieser Arbeit (Zellzyklusstopp, verminderte Proliferation und Migrationsfähigkeit sowie vermehrte Apoptose), so würde die PTTG1-Herunterregulation einen möglichen therapeutischen Ansatz bei Patienten mit NSCLC darstellen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das PTTG1 ist ein Onkogen, das mit einem aggressiven Phänotyp verschiedener Tumore assoziiert ist. Wir konnten in früheren Arbeiten zeigen, dass primäre NSCLC-Tumoren, insbesondere Adenokarzinome, eine PTTG1-Überexpression aufweisen. Dies war retrospektiv mit einem verkürzten Überleben der Patienten verbunden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die RNA-Interferenz für die Untersuchung hochregulierter Gene in NSCLC-Zelllinien eignet. Wir hemmten die PTTG1-mRNA-Überexpression in der Lungenadenokarzinom-Zelllinie H23 auf kaum nachweisbare Konzentrationen. Dafür wurden ein Lipofektionsreagenz und drei PTTG1-spezifische siRNAs verwendet. 72 h nach Lipofektion war die in der "real time" RT-PCR gemessene PTTG1-mRNA-Konzentration auf 3 bis 5% gesenkt worden. Die Kontroll-siRNA bewirkte keinen Effekt auf die PTTG1-mRNA. Auch auf Proteinebene waren mittels Western-Blot keine PTTG1-Proteinbanden nachweisbar.

Anschließend wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt, um Gene und Genengruppen zu identifizieren, die durch PTTG1-Herunterregulation beeinflusst werden. Hierbei fielen 79 Gene auf, die signifikant hoch- oder herunterreguliert waren und in sechs funktionelle Gruppen eingeteilt wurden: Zellzyklus, MAPK-Signalweg, Wachstumsfaktoren, Apoptose, WNT-Signalweg/Ca²⁺ und Adhäsionsmoleküle bzw. extrazelluläre Matrix. Die Ergebnisse sprechen insgesamt dafür, dass nach PTTG1-Herunterregulation der Zellzyklus gebremst bzw. gestoppt wird, die Apoptose aktiviert wird und die Migrationsfähigkeit vermindert ist.

Die funktionellen Experimente mit Proliferations- und Colony-Assays zeigten jedoch eine unveränderte Wachstumsrate in den mit PTTG1-siRNA behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, was zunächst auf die Zelllinie H23 und ihrem komplexen Karyotyp sowie gesteigerten Proliferationsrate zurückzuführen ist.

Weitere funktionelle Experimente sowie Experimente mit primären Zellen oder "in vivo" Tiermodellen sind notwendig, um die onkogene Rolle und die therapeutische Relevanz des PTTG1 im Lungenkarzinom weiter abzuklären.

LITERATURVERZEICHNIS

- Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen insgesamt und nach Geschlecht 2001. Seite des Statistischen Bundesamts, www.destatis.de . 11-3-2003.
- 2. Drings P. Management des Lungenkarzinoms.: Springer Verlag, Berlin; 2003.
- 3. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. CA Cancer J.Clin. 1999;49:8-31, 1.
- 4. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. BMJ 1997;315:980-988.
- Nakachi K, Imai K, Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. Cancer Res. 1991;51:5177-5180.
- Toh CK, Wong EH, Lim WT et al. The impact of smoking status on the behavior and survival outcome of patients with advanced non-small cell lung cancer: a retrospective analysis. Chest 2004;126:1750-1756.
- Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. J.Am.Diet.Assoc. 1996;96:1027-1039.
- Wynder EL, Hebert JR, Kabat GC. Association of dietary fat and lung cancer. J.Natl.Cancer Inst. 1987;79:631-637.
- 9. Ziegler RG, Mayne ST, Swanson CA. Nutrition and lung cancer. Cancer Causes Control 1996;7:157-177.
- Ayesh R, Idle JR, Ritchie JC, Crothers MJ, Hetzel MR. Metabolic oxidation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer. Nature 1984;312:169-170.
- Rudiger HW, Schwartz U, Serrand E et al. Reduced O6-methylguanine repair in fibroblast cultures from patients with lung cancer. Cancer Res. 1989;49:5623-5626.

- Seidegard J, Pero RW, Markowitz MM et al. Isoenzyme(s) of glutathione transferase (class Mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow up study. Carcinogenesis 1990;11:33-36.
- Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. Biochim.Biophys.Acta 1998;1378:F21-F59.
- Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Molecular genetics of lung cancer. Annu.Rev.Med. 2003;54:73-87.
- Braunwald et al. Harrison's Principles of Internal Medicine.: Mc Graw Hill;
 2001.
- 16. Travis WD, Travis LB, Devesa SS. Lung cancer. Cancer 1995;75:191-202.
- 17. Ganten D, Ruckpaul K. Molekularmedizinische Grundlagen von nichthereditären Tumorerkrankungen.: Springer; 2007.
- Greenblatt MS, Harris CC. Molecular genetics of lung cancer. Cancer Surv. 1995;25:293-313.
- 19. Pitterle DM, Jolicoeur EM, Bepler G. Hot spots for molecular genetic alterations in lung cancer. In Vivo 1998;12:643-658.
- 20. Fong KM, Sekido Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. J.Thorac.Cardiovasc.Surg. 1999;118:1136-1152.
- 21. Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD. Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. Thorax 2003;58:892-900.
- Hosoe S, Ueno K, Shigedo Y et al. A frequent deletion of chromosome 5q21 in advanced small cell and non-small cell carcinoma of the lung. Cancer Res. 1994;54:1787-1790.
- 23. Hosoe S. [Search for the tumor-suppressor gene(s) on chromosome 5q, which may play an important role for the progression of lung cancer]. Nippon Rinsho 1996;54:482-486.

- 24. Rohr UP, Rehfeld N, Geddert H et al. Prognostic relevance of fragile histidine triad protein expression in patients with small cell lung cancer. Clin.Cancer Res. 2005;11:180-185.
- Rohr UP, Rehfeld N, Pflugfelder L et al. Expression of the tyrosine kinase c-kit is an independent prognostic factor in patients with small cell lung cancer. Int.J.Cancer 2004;111:259-263.
- Gridelli C, Bareschino MA, Schettino C et al. Erlotinib in non-small cell lung cancer treatment: current status and future development. Oncologist. 2007;12:840-849.
- Maione P, Gridelli C, Troiani T, Ciardiello F. Combining targeted therapies and drugs with multiple targets in the treatment of NSCLC. Oncologist. 2006;11:274-284.
- Morgensztern D, Govindan R. Clinical trials of antiangiogenic therapy in nonsmall cell lung cancer: focus on bevacizumab and ZD6474.
 Expert.Rev.Anticancer Ther. 2006;6:545-551.
- 29. Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumortransforming gene (PTTG). Mol.Endocrinol. 1997;11:433-441.
- 30. Dominguez A, Ramos-Morales F, Romero F et al. hpttg, a human homologue of rat pttg, is overexpressed in hematopoietic neoplasms. Evidence for a transcriptional activation function of hPTTG. Oncogene 1998;17:2187-2193.
- Kakar SS, Jennes L. Molecular cloning and characterization of the tumor transforming gene (TUTR1): a novel gene in human tumorigenesis. Cytogenet.Cell Genet. 1999;84:211-216.
- McCabe CJ, Gittoes NJ. PTTG--a new pituitary tumour transforming gene.
 J.Endocrinol. 1999;162:163-166.
- Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR et al. Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). Mol.Endocrinol. 1999;13:156-166.

- Prezant TR, Kadioglu P, Melmed S. An intronless homolog of human protooncogene hPTTG is expressed in pituitary tumors: evidence for hPTTG family. J.Clin.Endocrinol.Metab 1999;84:1149-1152.
- Chen L, Puri R, Lefkowitz EJ, Kakar SS. Identification of the human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) family: molecular structure, expression, and chromosomal localization. Gene 2000;248:41-50.
- Honda S, Hayashi M, Kobayashi Y et al. A role for the pituitary tumortransforming gene in the genesis and progression of non-small cell lung carcinomas. Anticancer Res. 2003;23:3775-3782.
- Solbach C, Roller M, Peters S et al. Pituitary tumor-transforming gene (PTTG): a novel target for anti-tumor therapy. Anticancer Res. 2005;25:121-125.
- 38. Hamid T, Kakar SS. PTTG and cancer. Histol. Histopathol. 2003;18:245-251.
- Hornig NC, Knowles PP, McDonald NQ, Uhlmann F. The dual mechanism of separase regulation by securin. Curr.Biol. 2002;12:973-982.
- 40. Ramos-Morales F, Dominguez A, Romero F et al. Cell cycle regulated expression and phosphorylation of hpttg proto-oncogene product. Oncogene 2000;19:403-409.
- Zhou Y, Mehta KR, Choi AP, Scolavino S, Zhang X. DNA damage-induced inhibition of securin expression is mediated by p53. J.Biol.Chem. 2003;278:462-470.
- Bradshaw C, Kakar SS. Pituitary tumor transforming gene: an important gene in normal cellular functions and tumorigenesis. Histol.Histopathol. 2007;22:219-226.
- 43. Jallepalli PV, Waizenegger IC, Bunz F et al. Securin is required for chromosomal stability in human cells. Cell 2001;105:445-457.
- 44. Nowak MA, Komarova NL, Sengupta A et al. The role of chromosomal instability in tumor initiation. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2002;99:16226-16231.

- 45. Pei L. Activation of mitogen-activated protein kinase cascade regulates pituitary tumor-transforming gene transactivation function. J.Biol.Chem. 2000;275:31191-31198.
- 46. Yu R, Heaney AP, Lu W, Chen J, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy and p53-dependent and p53-independent apoptosis. J.Biol.Chem. 2000;275:36502-36505.
- Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP et al. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. J.Clin.Endocrinol.Metab 1999;84:761-767.
- Wang Z, Yu R, Melmed S. Mice lacking pituitary tumor transforming gene show testicular and splenic hypoplasia, thymic hyperplasia, thrombocytopenia, aberrant cell cycle progression, and premature centromere division. Mol.Endocrinol. 2001;15:1870-1879.
- 49. Wang Z, Moro E, Kovacs K, Yu R, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene-null male mice exhibit impaired pancreatic beta cell proliferation and diabetes. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2003;100:3428-3432.
- Yu R, Cruz-Soto M, Li CS, Hui H, Melmed S. Murine pituitary tumortransforming gene functions as a securin protein in insulin-secreting cells. J.Endocrinol. 2006;191:45-53.
- Cheng YX, Feng J, Zhang XY, Fu TY, Yao Y. [Human pituitary tumor transforming gene 1 expression in ovarian carcinoma and its clinical significance]. Ai.Zheng. 2004;23:1026-1030.
- 52. Hamid T, Kakar SS. PTTG/securin activates expression of p53 and modulates its function. Mol.Cancer 2004;3:18.
- 53. Heaney AP, Singson R, McCabe CJ et al. Expression of pituitary-tumour transforming gene in colorectal tumours. Lancet 2000;355:716-719.
- 54. Kim DS, Franklyn JA, Smith VE et al. Securin induces genetic instability in colorectal cancer by inhibiting double-stranded DNA repair activity. Carcinogenesis 2006

- Kim DS, Franklyn JA, Stratford AL et al. Pituitary tumor-transforming gene regulates multiple downstream angiogenic genes in thyroid cancer. J.Clin.Endocrinol.Metab 2006;91:1119-1128.
- Saez C, Japon MA, Ramos-Morales F et al. hpttg is over-expressed in pituitary adenomas and other primary epithelial neoplasias. Oncogene 1999;18:5473-5476.
- 57. Shibata Y, Haruki N, Kuwabara Y et al. Expression of PTTG (pituitary tumor transforming gene) in esophageal cancer. Jpn.J.Clin.Oncol. 2002;32:233-237.
- Wen CY, Nakayama T, Wang AP et al. Expression of pituitary tumor transforming gene in human gastric carcinoma. World J.Gastroenterol. 2004;10:481-483.
- 59. Hamid T, Malik MT, Kakar SS. Ectopic expression of PTTG1/securin promotes tumorigenesis in human embryonic kidney cells. Mol.Cancer 2005;4:3.
- Solbach C, Roller M, Fellbaum C, Nicoletti M, Kaufmann M. PTTG mRNA expression in primary breast cancer: a prognostic marker for lymph node invasion and tumor recurrence. Breast 2004;13:80-81.
- Yu R, Lu W, Chen J, McCabe CJ, Melmed S. Overexpressed pituitary tumortransforming gene causes aneuploidy in live human cells. Endocrinology 2003;144:4991-4998.
- Heaney AP, Melmed S. Pituitary tumour transforming gene: a novel factor in pituitary tumour formation. Baillieres Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab 1999;13:367-380.
- Ishikawa H, Heaney AP, Yu R, Horwitz GA, Melmed S. Human pituitary tumortransforming gene induces angiogenesis. J.Clin.Endocrinol.Metab 2001;86:867-874.
- McCabe CJ, Boelaert K, Tannahill LA et al. Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. J.Clin.Endocrinol.Metab 2002;87:4238-4244.

- McCabe CJ, Khaira JS, Boelaert K et al. Expression of pituitary tumour transforming gene (PTTG) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in human pituitary adenomas: relationships to clinical tumour behaviour. Clin.Endocrinol.(Oxf) 2003;58:141-150.
- 66. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. Nat.Genet. 2003;33:49-54.
- Bernal JA, Luna R, Espina A et al. Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis. Nat.Genet. 2002;32:306-311.
- 68. Pei L. Identification of c-myc as a down-stream target for pituitary tumortransforming gene. J.Biol.Chem. 2001;276:8484-8491.
- 69. Rehfeld N, Geddert H, Atamna A et al. The influence of the pituitary tumor transforming gene-1 (PTTG-1) on survival of patients with small cell lung cancer and non-small cell lung cancer. J.Carcinog. 2006;5:4.
- Couzin J. Nobel Prize in Physiology or Medicine. Method to silence genes earns loud praise. Science 2006;314:34.
- 71. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev. 2001;15:188-200.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 2001;411:494-498.
- ATCC. http://www.lgcpromochematcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=CRL-5800.
 2007.
- 74. BLAST. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST . 2007.
- Qiagen HiPerFect.
 http://www1.qiagen.com/Products/Transfection/TransfectionReagents/HiPerFe ctTransfectionReagent.aspx . 2007.

- Wikman H, Kettunen E. Regulation of the G1/S phase of the cell cycle and alterations in the RB pathway in human lung cancer. Expert.Rev.Anticancer Ther. 2006;6:515-530.
- Mu YM, Oba K, Yanase T et al. Human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) inhibits human lung cancer A549 cell growth through activation of p21(WAF1/CIP1). Endocr.J. 2003;50:771-781.
- 78. Dubrez L, Coll JL, Hurbin A et al. Cell cycle arrest is sufficient for p53mediated tumor regression. Gene Ther. 2001;8:1705-1712.
- Vicent S, Garayoa M, Lopez-Picazo JM et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients. Clin.Cancer Res. 2004;10:3639-3649.
- Vicent S, Lopez-Picazo JM, Toledo G et al. ERK1/2 is activated in non-smallcell lung cancer and associated with advanced tumours. Br.J.Cancer 2004;90:1047-1052.
- Eerola I, Boon LM, Mulliken JB et al. Capillary malformation-arteriovenous malformation, a new clinical and genetic disorder caused by RASA1 mutations. Am.J.Hum.Genet. 2003;73:1240-1249.
- Cosgrave N, Hill AD, Young LS. Growth factor-dependent regulation of survivin by c-myc in human breast cancer. J.Mol.Endocrinol. 2006;37:377-390.
- Qiu W, Zhou B, Zou H et al. Hypermethylation of growth arrest DNA damageinducible gene 45 beta promoter in human hepatocellular carcinoma. Am.J Pathol. 2004;165:1689-1699.
- Besse B, Cande C, Spano JP et al. Nuclear localization of apoptosis protease activating factor-1 predicts survival after tumor resection in early-stage nonsmall cell lung cancer. Clin.Cancer Res. 2004;10:5665-5669.
- Krepela E, Prochazka J, Liul X, Fiala P, Kinkor Z. Increased expression of Apaf-1 and procaspase-3 and the functionality of intrinsic apoptosis apparatus in non-small cell lung carcinoma. Biol.Chem. 2004;385:153-168.

- Krepela E, Prochazka J, Fiala P, Zatloukal P, Selinger P. Expression of apoptosome pathway-related transcripts in non-small cell lung cancer. J.Cancer Res.Clin.Oncol. 2006;132:57-68.
- Borczuk AC, Papanikolaou N, Toonkel RL et al. Lung adenocarcinoma invasion in TGFbetaRII-deficient cells is mediated by CCL5/RANTES. Oncogene 2007
- 88. Huntley SP, Davies M, Matthews JB et al. Attenuated type II TGF-beta receptor signalling in human malignant oral keratinocytes induces a less differentiated and more aggressive phenotype that is associated with metastatic dissemination. Int.J.Cancer 2004;110:170-176.
- Anumanthan G, Halder SK, Osada H et al. Restoration of TGF-beta signalling reduces tumorigenicity in human lung cancer cells. Br.J.Cancer 2005;93:1157-1167.
- Turley RS, Finger EC, Hempel N et al. The type III transforming growth factorbeta receptor as a novel tumor suppressor gene in prostate cancer. Cancer Res. 2007;67:1090-1098.
- Hurbin A, Dubrez L, Coll JL, Favrot MC. Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. Ann.N.Y.Acad.Sci. 2003;1010:354-357.
- 92. Hurbin A, Coll JL, Dubrez-Daloz L et al. Cooperation of amphiregulin and insulin-like growth factor-1 inhibits Bax- and Bad-mediated apoptosis via a protein kinase C-dependent pathway in non-small cell lung cancer cells. J.Biol.Chem. 2005;280:19757-19767.
- 93. Oh SH, Kim WY, Kim JH et al. Identification of insulin-like growth factor binding protein-3 as a farnesyl transferase inhibitor SCH66336-induced negative regulator of angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. Clin.Cancer Res. 2006;12:653-661.
- Ahn J, Weinstein SJ, Snyder K et al. No association between serum insulinlike growth factor (IGF)-I, IGF-binding protein-3, and lung cancer risk. Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. 2006;15:2010-2012.

- Li J HMPT. Clinical significance of VEGF-C and VEGFR-3 expression in nonsmall cell lung cancer. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2006;26:587-590.
- 96. Wnt-Website. http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html . 6-8-1997.
- 97. Tanjore H, Kalluri R. The role of type IV collagen and basement membranes in cancer progression and metastasis. Am.J Pathol. 2006;168:715-717.
- Malik MT, Kakar SS. Regulation of angiogenesis and invasion by human Pituitary tumor transforming gene (PTTG) through increased expression and secretion of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). Mol.Cancer 2006;5:61.
- 99. Maatta M, Soini Y, Paakko P et al. Expression of the laminin gamma2 chain in different histological types of lung carcinoma. A study by immunohistochemistry and in situ hybridization. J Pathol. 1999;188:361-368.
- Semba S, Iwaya K, Matsubayashi J et al. Coexpression of actin-related protein 2 and Wiskott-Aldrich syndrome family verproline-homologous protein 2 in adenocarcinoma of the lung. Clin.Cancer Res. 2006;12:2449-2454.
- 101. King TJ, Lampe PD. The gap junction protein connexin32 is a mouse lung tumor suppressor. Cancer Res. 2004;64:7191-7196.
- Ruch RJ, Cesen-Cummings K, Malkinson AM. Role of gap junctions in lung neoplasia. Exp.Lung Res. 1998;24:523-539.
- 103. Ruch RJ, Porter S, Koffler LD, Dwyer-Nield LD, Malkinson AM. Defective gap junctional intercellular communication in lung cancer: loss of an important mediator of tissue homeostasis and phenotypic regulation. Exp.Lung Res. 2001;27:231-243.
- 104. Zhang ZQ, Zhang W, Wang NQ et al. Suppression of tumorigenicity of human lung carcinoma cells after transfection with connexin43. Carcinogenesis 1998;19:1889-1894.
- 105. Han S, Sidell N, Roman J. Fibronectin stimulates human lung carcinoma cell proliferation by suppressing p21 gene expression via signals involving Erk and Rho kinase. Cancer Lett. 2005;219:71-81.

106. Han S, Khuri FR, Roman J. Fibronectin stimulates non-small cell lung carcinoma cell growth through activation of Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase and inactivation of LKB1/AMP-activated protein kinase signal pathways. Cancer Res. 2006;66:315-323.

EIGENE PUBLIKATIONEN

- Rehfeld N, Geddert H, Atamna A, Rohrbeck A, Garcia G, Kliszewski S, Neukirchen J, Bruns I, Steidl U, Fenk R, Gabbert HE, Kronenwett R, Haas R, Rohr UP. The influence of the pituitary tumor transforming gene-1 (PTTG-1) on survival of patients with small cell lung cancer and non-small cell lung cancer. J Carcinog. 2006 Jan 20;5:4.
- Neukirchen J, Meier A, Rohrbeck A, Garcia-Pardillos G, Steidl U, Fenk R, Haas R, Kronenwett R, Rohr UP. The proteasome inhibitor bortezomib acts differently in combination with p53 gene transfer or cytotoxic chemotherapy on NSCLC cells. Cancer Gene Ther. 2007 Apr;14(4):431-9.

CURRICULUM VITAE

Geburtsdatum	15. März 1980
Geburtsort	Granada, Spanien
Familienstand	ledig

Schulausbildung

1986-1992	Grundschule "Colegio Público Real", Melilla, Spanien
1992-1998	Gymnasium "I.E.S. Enrique Nieto", Melilla, Spanien
1998	Abitur

<u>Studium</u>

1998-2004	Humanmedizin, Universität von Granada, Spanien
2002-2003	Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
Juni 2004	Approbation als Arzt

Weiterbildung

Seit Oktober 2004 Assistenzarzt an der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf

DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ralf Kronenwett für die hervorragende wissenschaftliche und persönliche Betreuung. Dank seiner professionellen Unterstützung konnte ich diese Arbeit zum Erfolg bringen.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Rainer Haas danke ich für die Möglichkeit, an seiner Klinik zu promovieren. Ohne die Laborrotationen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Peter Rohr für die Überlassung des Themas, seine hervorragende Mitbetreuung und die Einführung in die Laborarbeit.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Sascha Raschke, Herrn Dr. rer. nat. Mark Korthals und Frau Dr. rer. nat. Astrid Rohrbeck möchte ich mich für ihre Hilfe in der Durchführung der Western-Blots und der Genexpressionsanalysen herzlich bedanken.

Herrn Dr. rer. nat. Michael Rosskopf danke ich für die statistische Betreuung, Frau Dr. rer. nat. Barbara Hildebrandt für die Durchführung der zytogenetischen Untersuchung und Frau Dr. med. Diallo-Danebrock für die Verarbeitung der immunhistochemischen Färbungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Ingmar Bruns für seine Anregungen und das Interesse an meiner Arbeit sowie allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Schließlich danke ich der Leukämie Liga Düsseldorf e.V.