

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. Hermann Einsele

**Inaktivierung von HDGF in HT29-Zellen durch siRNA**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Anika Grell  
aus Ludwigsburg

Würzburg, Februar 2010

Referent: Priv.-Doz. Dr. Ralph Melcher  
Koreferent: Prof. Dr. Tiemo Grimm  
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch  
Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2010  
Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern Maritta und Bernd Ledwoch

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Das kolorektale Karzinom.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologie.....	1
1.1.3	Histologie.....	1
1.1.4	Lokalisation .....	2
1.1.5	Stadien .....	2
1.1.6	Pathogenese .....	2
1.1.6.1	Adenom-Karzinom-Sequenz .....	2
1.1.6.2	Onkogene.....	3
1.1.6.3	Tumorsuppressorgene .....	3
1.1.6.4	Tumorprogressionsmodell .....	3
1.2	Hepatoma Derived Growth Factor (HDGF) .....	4
1.2.1	Struktur.....	4
1.2.2	Physiologische Expression.....	6
1.2.3	Expression in Malignomen .....	7
1.2.4	Regulation und Wirkungsweise .....	9
1.3	RNA Interferenz.....	10
1.3.1	Bedeutung der RNA Interferenz .....	10
1.3.2	Mechanismus der RNA Interferenz .....	11
1.3.3	Anwendung der RNA Interferenz.....	11
1.4	Inaktivierung von HDGF durch RNA Interferenz.....	12
1.5	Zielsetzung der Arbeit .....	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
2.1	Material.....	14
2.1.1	Geräte .....	14
2.1.2	Chemikalien.....	15
2.1.3	Enzyme und Puffer.....	16
2.1.4	Fertigsätze.....	16
2.1.5	Standardlösungen .....	17
2.1.6	Bakterien .....	17

2.1.7	Medien für Bakterien .....	17
2.1.8	Eukaryontische Zelllinie.....	18
2.1.9	Oligonukleotide.....	18
2.1.9.1	siRNA-Inserts .....	18
2.1.9.2	Plasmidvektor.....	20
2.1.9.3	Primer für PCR und Sequenzierung .....	21
2.1.9.4	Sonde und Primer für Realtime-PCR .....	21
2.2	Molekularbiologische und molekulargenetische Methoden .....	21
2.2.1	Hybridisierung von DNA .....	21
2.2.2	Ligation von DNA .....	22
2.2.3	Transformation .....	23
2.2.4	Kolonie-PCR.....	23
2.2.5	Minipräparation.....	24
2.2.6	Verdau.....	25
2.2.7	Agarosegelelektrophorese.....	25
2.2.8	Maxipräparation.....	26
2.2.9	Nukleinsäure-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung.....	27
2.2.10	Sequenzierung .....	27
2.2.11	Realtime-PCR .....	29
2.2.11.1	RNA-Präparation .....	30
2.2.11.2	Aufreinigung und DNase-Behandlung .....	31
2.2.11.3	cDNA-Synthese.....	32
2.2.11.4	Realtime-PCR .....	32
2.2.12	Genexpressionsanalyse .....	34
2.3	Zellkultur.....	34
2.3.1	Kultivierung von HT29-Zellen .....	34
2.3.2	Zytotoxizitätstest.....	34
2.3.3	Transfektion von Zellen .....	34
2.3.3.1	Transiente Transfektion.....	35
2.3.3.2	Stabile Transfektion.....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
3.1	Klonierung von hdgf-siRNA II/IV in den Plasmidvektor.....	37

3.2	Transformation von E.coli mit pSilencer puro II/IV.....	37
3.3	Kolonie-PCR von Klonen mit pSilencer puro II/IV.....	39
3.4	Maxipräparation von pSilencer puro II/IV .....	40
3.5	Sequenzierung von hdgf-siRNA II/IV .....	41
3.6	Zytotoxizitätstest der HT29-Zellen mit Puromycin .....	42
3.7	Transfektion von HT29 mit pSilencer puro II/IV .....	42
3.7.1	Transiente Transfektion von HT29 mit pSilencer puro II/IV .....	43
3.7.2	Stabile Transfektion von HT29 mit pSilencer puro II/IV .....	44
3.8	Genexpressionsanalyse .....	45
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>49</b>
4.1	Inaktivierung von HDGF durch RNA Interferenz.....	49
4.1.1	Inaktivierung von HDGF in Kolonkarzinomzelllinie HT29 .....	49
4.1.2	Auswirkungen der Inaktivierung von HDGF auf die Expression anderer Gene .....	49
4.1.2.1	CRCX4 und CXCL12.....	49
4.1.2.2	CEACAM.....	50
4.1.2.3	MAGE .....	52
4.2	Unerwünschte Effekte der Inaktivierung von Genen mittels RNA Interferenz .....	53
4.3	Inaktivierung von HDGF in einer NSCLC-Zelllinie .....	54
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>65</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	65
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	69
7.3	Tabellenverzeichnis.....	70

**Lebenslauf**

**Danksagung**

# **1 Einleitung**

## **1.1 Das kolorektale Karzinom**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Das kolorektale Karzinom gehört zu den häufigsten Krebserkrankungen der westlichen Industriestaaten. In Deutschland wird die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen für Männer und Frauen auf jeweils etwas über 35.000 geschätzt. Für beide Geschlechter ist das kolorektale Karzinom in Deutschland mittlerweile die zweithäufigste Krebserkrankung sowie die zweithäufigste Krebstodesursache. Männer erkranken im Mittel im Alter von 69 Jahren, Frauen dagegen später mit 75 Jahren. (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und Robert Koch Institut 2006).

### **1.1.2 Ätiologie**

Die Ätiologie des kolorektalen Karzinoms ist nicht sicher geklärt. Als Risikofaktoren kommen sowohl exogene als auch endogene Faktoren in Betracht. Zu den exogenen Faktoren zählen Bewegungsarmut und Übergewicht sowie bestimmte Ernährungsgewohnheiten wie der Verzehr von viel rotem Fleisch, vielen tierischen Fetten, ein regelmäßiger Alkoholkonsum und ein Mangel an Ballaststoffen. Als endogene Ursachen kommen eine genetische Prädisposition, gesicherte kolorektale Adenome sowie das Vorhandensein von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa in Betracht (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und Robert Koch Institut 2006).

### **1.1.3 Histologie**

Beim kolorektalen Karzinom handelt es sich histologisch um Adenokarzinome, die bezüglich des Gratings in Low-grade-Karzinome und High-grade-Karzinome unterteilt werden. Die Low-grade-Karzinome werden in gut (G1) und mäßig (G2) differenzierte Karzinome unterteilt. Die High-Grade-Karzinome werden in schlecht differenzierte muzinöse und nicht-muzinöse

Adenokarzinome (G3) sowie in Siegelringzellkarzinome, kleinzellige und undifferenzierte Karzinome (G4) unterteilt.

#### 1.1.4 Lokalisation

Das kolorektale Karzinom ist zu etwa 60 % im Rektum, zu etwa 20 % im Sigma, zu ungefähr 10 % im Coecum bzw. Colon ascendens sowie zu etwa 10 % im Colon transversum und Colon descendens lokalisiert. In 2-5 % der Fälle tritt das kolorektale Karzinom multipel auf.

#### 1.1.5 Stadien

Zur Stadieneinteilung kolorektaler Karzinome existieren verschiedene Systeme, es werden jedoch vorwiegend die TNM-, Dukes- und UICC- Einteilung verwendet.

Definition	UICC	TNM			Dukes
Carcinoma in situ	0	TIS	N0	M0	
Ia: Beschränkung auf Mukosa und Submukosa	I	T1	N0	M0	A
Ib: Infiltration Muscularis propria		T2	N0	M0	
Infiltration aller Wandschichten	II	T3	N0	M0	B
Überschreitung der Darmwand		T4	N0	M0	
Regionale Lymphknoten oder Infiltration Umgebung	III	Tx	N1-3	M0	C
Fernmetastasen	IV	Tx	Nx	M1	D

Tab. 1: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms

#### 1.1.6 Pathogenese

##### 1.1.6.1 Adenom-Karzinom-Sequenz

Nach der Adenom-Karzinom-Sequenz (Vogelstein et al. 1988; Fearon et al. 1990) entwickelt sich das kolorektale Karzinom über verschiedene Adenom-Zwischenstufen aus dem Normalepithel des Dickdarms. Hierbei werden die

Stadien des frühen, intermediären und fortgeschrittenen Adenoms durchlaufen. Der Zeitraum der Entwicklung eines Karzinoms aus seinen Vorstufen kann einen Zeitraum von etwa 10 Jahren umfassen.

### **1.1.6.2 Onkogene**

Die Expressionsprodukte von Protoonkogenen spielen eine wichtige Rolle bei der Steuerung und Regulation von Wachstum, Teilung und Differenzierung einer Zelle. Durch verschiedene Schädigungsmechanismen am zellulären Genom, wie z.B. Punktmutationen, Translokationen, Genamplifikationen und andere Chromosomenanomalien, können die Protoonkogene zu Onkogenen aktiviert werden. Da Protoonkogene ein dominantes Verhalten aufweisen, führt schon der Verlust oder die Mutation eines Allels zu der Aktivierung des Onkogens. Dies kann zu einer gesteigerten zellulären Eigenfunktion durch konstitutive Aktivierung oder einer erhöhten Aktivität der Genprodukte mit gesteigerter physiologischer Signalantwort führen.

### **1.1.6.3 Tumorsuppressorgene**

Diese Gene greifen normalerweise supprimierend in den Mechanismus der Zellproliferation ein und sind unter anderem für DNA-Reparatur und die Beeinflussung von Adhäsionsproteinen zuständig. Tumorsuppressorgene weisen im Gegensatz zu den Onkogenen ein rezessives Verhalten auf. Zur Aufrechterhaltung der Wachstumshemmung durch Tumorsuppressorgene reicht ein Allel aus, ein Funktionsverlust der Tumorsuppressorgene macht sich daher erst beim allelischen Verlust beider Genkopien bemerkbar. Zum allelischen Verlust beider Genkopien kann es durch Punktmutationen, Deletionen von kurzen DNA-Regionen und Chromosomenverlusten kommen. Auch genetische Rekombinationen und die CpG-island-Methylation führen zum Funktionsverlust der Tumorsuppressorgene.

### **1.1.6.4 Tumorprogressionsmodell**

Störungen im genetischen Programm von Zellen, die einen Einfluss auf deren Wachstum haben und zu Größenzunahme, Invasion und Metastasierung

führen, betreffen hauptsächlich Tumorsuppressorgene und Protoonkogene sowie DNA-Reparaturgene.

Die Tumorigenese des kolorektalen Karzinoms beruht auf sequentieller Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Im Tumorprogressionsmodell (Vogelstein et al. 1988; Fearon et al. 1990) werden den Entwicklungsstufen des Karzinoms die jeweiligen Mutationen bzw. Verluste von Genen zugeordnet. Für die Entstehung des Karzinoms ist hierbei eher die Akkumulation bestimmter genetischer Veränderungen als deren Reihenfolge von Bedeutung.

Durch Mutation oder Verlust des APC-Tumorsuppressor-Gens (5q21) entsteht zunächst ein frühes/kleines Adenom, welches durch eine Aktivierung des K-RAS-Onkogens sowie durch einen Funktionsverlust des DCC-Tumorsuppressorgens (18q21) zunehmend dysplastischer wird und durch Verlust oder Mutation des p53-Suppressor-Gens (17p13) in ein Karzinom übergehen kann (Vogelstein et al. 1988; Fearon et al. 1990; Grady et al. 2002).

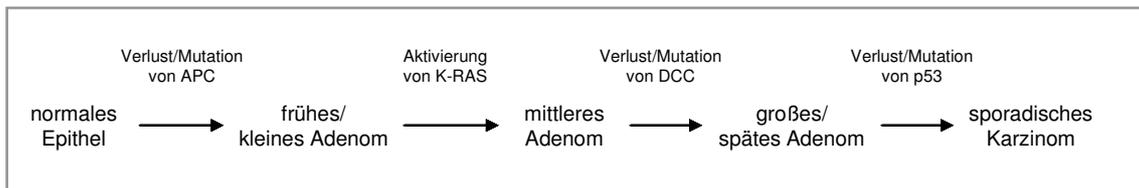


Abb. 1: Genetisches Tumorprogressionsmodell

## 1.2 Hepatoma Derived Growth Factor (HDGF)

### 1.2.1 Struktur

Der Hepatoma Derived Growth Factor (HDGF), lokalisiert im Bereich Xq25, wurde erstmals 1994 von Nakamura et al. aus dem konditionierten Medium humaner HuH-7-Zellen, die aus einer Hepatom-Zelllinie stammen, isoliert. Die Klonierung einer komplementären DNA aus der cDNA-library der HuH-7-Zelllinie wurde anhand der N-terminalen Aminosäuresequenz von Nakamura et al. 1994 durchgeführt. Das Ergebnis war ein 2,4 kbp langes cDNA-Segment, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz ein Peptid-Monomer von 240

Aminosäuren ohne eine signalpeptidähnliche hydrophobe N-terminale Sequenz aufweist. Die Sequenz des Peptids zeigt deutliche Homologien zur HMG-1 (high mobility group 1). Es besteht eine Ähnlichkeit bei 35,6 % und eine Gleichheit bei 23,4 % der Aminosäuren. Allerdings fehlen die für HMG-Proteine typischen DNA-bindenden Domänen wie die HMG-Box (Nakamura et al. 1994).

HDGF und die Familie der HRP (HDGF Related Proteins) teilen sich eine N-terminale Aminosäuresequenz namens HATH (Homologous at the Amino Terminus of HDGF), die spezifisch für diese Proteinfamilie ist. Die HATH-Domäne enthält die nukleäre Lokalisierungssequenz NLS1 (<sup>75</sup>KPNKRK<sup>80</sup>). Außerdem verfügt HDGF über ein zweiteiliges nukleäres Lokalisierungssignal NLS2 (<sup>155</sup>KRRAGLLEDSPKRPK<sup>170</sup>), das sich an seiner C-terminalen genspezifischen Region außerhalb der HATH-Domäne befindet (Kishima et al. 2002).

Eine Translokation von HDGF in den Nukleus führt zu einer Steigerung der DNA-Synthese und zur Mitogenese mit Steigerung der Zellproliferation. Laut Kishima et al. 2002 transloziert HDGF in lebenden Zellen über die nukleären Lokalisierungssequenzen NLS1 und NLS2 in den Nukleus. Diese nukleäre Translokation von HDGF ist essentiell für seine Wirkung auf die DNA-Synthese und Zellproliferation. Es spielt dabei keine Rolle, ob HDGF intern überexprimiert oder von extern zugeführt wird. Durch die NLS2 der genspezifischen Region kann HDGF auch in Abwesenheit von NLS1 in den Nukleus translozieren, während die NLS1 der HATH-Region eher als Helfer bei der nukleären Translokation fungiert (Kishima et al. 2002). Bei den Familienmitgliedern HRP-1 und HRP-3 reicht die HATH-Region alleine für eine nukleäre Translokation aus (Kuroda et al. 1999; Ikegame et al. 1999). Im Zellkern ist die genspezifische Sequenz essentiell für die mitogene Aktivität von HDGF, während die HATH-Sequenz alleine hier keinen mitogenen Effekt hat. Die HATH-Region ist jedoch von großer Bedeutung für die Internalisierung von extern zugeführtem HDGF in die Zelle. Ohne die HATH-Region kann extern zugeführtes HDGF nicht internalisiert und die DNA-Synthese nicht gesteigert werden (Kishima et al. 2002).

HDGF stellt den bislang ersten und einzigen nukleär wirksamen Wachstumsfaktor dar (Nakamura et al. 1994), der genaue Wirkmechanismus von HDGF im Zellkern ist allerdings bislang noch nicht bekannt.

### **1.2.2 Physiologische Expression**

Nakamura et al. zeigten schon im Jahre 1994, dass HDGF sowohl in Tumorzellen als auch in Normalgewebe ubiquitär auf mRNA-Ebene exprimiert wird. Eine genauere Differenzierung wurde zu dem Zeitpunkt noch nicht vorgenommen. Die Bedeutung von HDGF in der Organogenese sowie in der Tumorgenese wurde seitdem genauer untersucht. Die Untersuchungen beschränken sich auf Tiermodelle.

In der Entwicklung der Niere von Ratten ist HDGF besonders anfangs hoch exprimiert. Im Verlauf der Entwicklung der Niere konzentriert sich die hohe Expression dann auf Herde der aktiven Morphogenese, und in der erwachsenen Niere ist die Expression von HDGF dann bis auf wenige Herde in distalen Tubuli stark reduziert (Oliver et al. 1998).

HDGF ist auch an der Entwicklung des kardiovaskulären Systems beteiligt. Es stimuliert das Wachstum glatter Muskelzellen und wird während der Entwicklung von Gefäßen stark exprimiert. Eine exogene oder endogene Überexpression von HDGF bewirkt in der glatten Muskulatur einen signifikanten Anstieg an glatten Muskelzellen und DNA-Synthese (Everett 2000). Everett et al. zeigten im Jahre 2000 auch, dass die mRNA von HDGF in der fetalen Aorta massiv exprimiert wird. In vivo lässt sich eine Reexpression in den Kernen glatter Muskelzellen durch aortic banding und durch selektive Intimaläsion mittels Ballonkatheter in den Intimazellen induzieren (Everett et al. 2001). HDGF ist der erste auf nukleärer Ebene wirkende, beschriebene Wachstumsfaktor des embryonalen Herzens der Ratte (Everett 2001).

Im Darm der Ratte ist der Expressionsgrad von HDGF im fetalen Gewebe ungefähr 2-fach höher als im adulten Gewebe (Everett 2001).

In der Hepatogenese zeigen die fetalen Hepatozyten eine sehr hohe Expression von HDGF mit einer sukzessiven Expressionsreduktion bis zum fast

kompletten Verlust der Nachweisbarkeit um den Geburtszeitpunkt der Tiere herum (Enomoto et al. 2002). HDGF steigert das Wachstum von Hepatozyten aller Reifungsstadien und hilft bei der Regulation der Hepatozyten-Differenzierung. Das gene silencing mittels anti-sense-HDGF-RNA führt entsprechend zur Reduktion der Proteinexpression von HDGF sowie zur Reduktion der Hepatozytenproliferation (Enomoto et al. 2002).

Auch in der Entwicklung der Lungenendothelien spielt HDGF eine Rolle und ist dabei sehr hoch exprimiert. Bei adulten Tieren findet sich in den Endothelien der kleinen Lungenkapillaren eine Persistenz der Expression von HDGF. Aus der Überexpression resultiert eine gesteigerte Zellmigration (Everett 2004).

In der Lunge hat HDGF durch seinen mitogenen Effekt einen Einfluss auf die Organentwicklung und Remodellierung des Bronchialepithels. Bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose (IPF) ist die Proteinexpression besonders in epithelialen Zellen gegenüber einem gesunden Kollektiv stark erhöht. Diese Beobachtungen lassen sich im Tiermodell unter Verwendung von Bleomycin reproduzieren. Die Steigerung der DNA-Synthese und der mitogene Effekt sind ebenfalls nachvollziehbar. Eine intratracheale Instillation von HDGF induziert zwar die Proliferation von bronchialen und alveolären epithelialen Zellen, jedoch treten die für die IPF typischen entzündlichen Veränderungen hier nicht auf (Mori et al. 2004). Cilley et al. zeigten im Jahr 2000, dass auch ein erhöhter intratrachealer Druck zu einer Steigerung der pulmonalen Expression von HDGF führt.

Obwohl der Einfluss von HDGF auf die Entstehung von verschiedenen Geweben nachgewiesen werden konnte, sind die genauen Wirkmechanismen von HDGF bislang noch nicht bekannt.

### **1.2.3 Expression in Malignomen**

HDGF wurde erstmals aus der humanen Hepatom- Zelllinie HuH-7 isoliert (Nakamura et al. 1994). Sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern von Hepatomzellen und Hepatozyten kann HDGF nachgewiesen werden (Hu et al. 2003). Die HDGF-Spiegel in Hepatom-Gewebeproben sind jedoch signifikant höher als im umliegenden gesunden Gewebe. Erhöhte HDGF-Spiegel

korrelieren dabei signifikant mit einem Verlust der Differenzierung, einem Fehlen der Tumorkapsel sowie einem hohen AFP-Spiegel. Nukleäres HDGF kann prognostisch als unabhängiger Faktor bezüglich allgemeinen Überlebens und rezidivfreien Überlebens herangezogen werden. Patienten mit einer hohen Expression haben insgesamt eine kürzere Überlebenszeit und eine höhere Rezidivrate (Hu et al. 2003).

Yoshida et al. zeigten 2003 am Mausmodell den Einfluss von HDGF in der Hepatokarzinogenese im Rahmen der Steatohepatitis. In der Leber von FLS-Mäusen (fatty liver Shionogi mice) ist die Expression von HDGF schon in einem frühen Stadium vor der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms erhöht (Yoshida et al. 2003).

Für Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) ist die Expression von HDGF ein wichtiger prognostischer Faktor. HDGF ist in NSCLC überexprimiert. Der Expressionsgrad korreliert stark mit einem schlechten allgemeinen, krankheitsspezifischen und krankheitsfreien Überleben (Ren et al. 2004).

Auch in Melanomen konnte eine gesteigerte Expression von HDGF im Vergleich zur Expression in Melanozyten und Naevi festgestellt werden. Besonders in frühen und späten Neoplasiestadien ist die Expression sehr hoch (Bernard et al. 2003).

Okuda et al. zeigten, dass eine Überexprimierung von HDGF in vivo die Tumorentstehung durch intrinsische angiogene Aktivität und eine Induktion von VEGF induziert (Okuda et al. 2003).

Im Darm wird die HDGF-mRNA während der Embryogenese stark exprimiert, die Spiegel sinken jedoch im Rahmen der Differenzierung des Darmgewebes erheblich. Interessanterweise zeigt sich im kolorektalen Karzinom eine dramatisch erhöhte Expression, besonders in Tumoren mit DNA mismatch repair (Lepourcelet et al. 2005). Lepourcelet et al. zeigten in 11 von 16 kolorektalen Karzinomen mit DNA mismatch repair eine Überexpression von HDGF. Insgesamt fanden sie in 14 von 28 kolorektalen Karzinomen eine starke Überexpression.

In der Behandlung von Ösophaguskarzinomen scheint eine hohe mRNA-Expression von HDGF in den Tumorzellen für eine höhere Sensitivität gegenüber der Bestrahlung zu sprechen, so dass HDGF ein neuer prognostischer Marker für die Effektivität einer Bestrahlungstherapie werden könnte (Matsuyama et al. 2001).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass HDGF auch in der Karzinogenese eine zentrale Rolle spielt. Die genauen Wirkmechanismen sind jedoch, wie in der Embryogenese, noch unklar.

### **1.2.4 Regulation und Wirkungsweise**

Über die genauen Wirkmechanismen und die Regulation von HDGF ist bislang nur wenig bekannt. HDGF lässt sich derzeit noch nicht in bekannte Signalwege einordnen und auch die Definition von neuen Signalwegen ist noch nicht gelungen. Die bisherigen Kenntnisse bezüglich Regulation und Wirkmechanismus beschränken sich auf einige Beobachtungen zur Proteinkinase C und dem Bereich stressaktivierter Kinasen im Zusammenspiel mit VEGF sowie zur TNF/CHX-induzierten Apoptose.

In HuH-7-Zellen supprimiert eine Inhibition der Proteinkinase C das Wachstum der Zellen, die Produktion von HDGF scheint jedoch in diesen Zellen nicht beeinflusst zu werden. In Swiss 3T3-Zellen führt eine Inhibition der Proteinkinase C zu einer kompletten Hemmung der proliferationssteigernden Wirkung von exogen zugeführtem HDGF (Kambe et al. 2000).

Im Bereich der Angiogenese führt HDGF zu einer raschen Aktivierung von Erk1/2, während VEGF zu einer Aktivierung von Erk1/2, Akt und SAPK/JNK führt (Everett et al. 2004). Die Expression von VEGF scheint in den Versuchen von Everett durch HDGF nicht beeinflusst zu werden (Everett et al. 2004). In den Versuchen von Okuda jedoch zeigte sich, dass eine transiente Expression von HDGF sowohl die Gen- als auch die Proteinexpression von VEGF signifikant induziert (Okuda et al. 2003). Eine externe Zuführung von VEGF bewirkte eine Reduktion der HDGF-Expression um 50 % (Everett et al. 2004).

Hinsichtlich der TNF/CHX-induzierten Apoptose von Zellen scheint eine Inaktivierung von HDGF durch RNA Interferenz zu einer Verhinderung der Apoptose zu führen. Das Stilllegen des HDGF-Gens verhindert die Ausschüttung von Smac/Diablo während einer TNF- $\alpha$  Behandlung. Es wird daher vermutet, dass ein Mangel an HDGF mit der Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien interferiert. HDGF scheint folglich ein Modulator der zellulären Apoptose zu sein (Machuy et al. 2005).

### **1.3 RNA Interferenz**

#### **1.3.1 Bedeutung der RNA Interferenz**

Für die Entdeckung der RNA Interferenz erhielten Mello und Fire im Jahre 2006 den Nobelpreis für Physiologie/Medizin. Die RNA Interferenz stellt einen zellulären Mechanismus zur Unterdrückung der Expression homologer Gene durch Erkennen und Prozessieren von doppelsträngiger RNA dar. Die doppelsträngige RNA kann dabei entweder von außen in die Zelle gelangen oder innerhalb der Zelle generiert werden. Die Bedeutung der RNA Interferenz für die Zelle ist vielfältig. Sie liegt unter anderem im Schutz der Zelle vor viralen Angriffen sowie der Sicherung genomischer Stabilität. Der RNA Interferenz ähnliche Prozesse dienen der Regulation der Entwicklung von Organismen durch Unterdrückung der Proteinsynthese, der Aufrechterhaltung der Kondensation des Chromatins und der Unterdrückung der Transkription (Daneholt 2006).

Virale dsRNA führt in der Zelle zum Beispiel zu einer Interferon-vermittelten Aktivierung des Jak-Stat Signalwegs und gipfelt letztendlich in der Induktion von Interferon-stimulierten Genen im Nukleus (Sledz et al. 2003). Dieser Effekt wird durch die dsRNA-abhängige Proteinkinase PKR vermittelt, deren Aktivierung durch virale dsRNA zu einer Autophosphorylierung und folgend zu einer Phosphorylierung einer Untereinheit des eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  führt (Srivastava et al 1998). Das Resultat ist eine generelle Inhibition der zellulären Proteinsynthese (Sledz et al. 2003).

### 1.3.2 Mechanismus der RNA Interferenz

Die doppelsträngige RNA (dsRNA) wird in der Zelle durch ein Enzym namens Dicer, eine ATP-abhängige Ribonuklease, gebunden und unter ATP-Verbrauch in so genannte small interfering RNAs (siRNAs) der Größe 21-23 Nukleotide zerschnitten. Die RNA wird dadurch inaktiviert. Die siRNAs werden dann in einen Riboprotein-Komplex namens "RNA-Induced Silencing Complex" (RISC) integriert und ihr Doppelstrang mit Hilfe von Helikasen geöffnet. Komplementäre mRNA kann nun an die Einzelstrang-siRNA (ssRNA) binden. Das wiederum aktiviert den RISC und die mRNA wird gespalten. Die mRNA-Stücke sind damit dem Verdauungsprozess in der Zelle ausgeliefert und es kann kein oder nur noch wenig Protein gebildet werden.

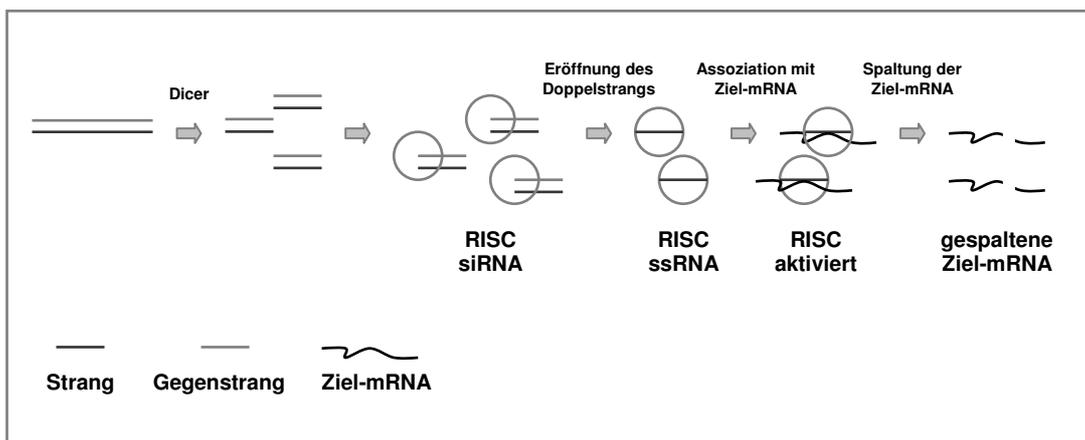


Abb. 2: Mechanismus der RNA Interferenz

### 1.3.3 Anwendung der RNA Interferenz

Die Entdeckung des Mechanismus der RNA Interferenz (RNAi) durch Mello und Fire machte diese Methode zu einem wichtigen Instrument der Grundlagenforschung. So kann die RNA Interferenz zur Untersuchung der Funktion bestimmter Gene, zur Analysierung von Signalwegen sowie zur Identifizierung und Validierung von Zielgenen für Therapeutika angewendet werden. Auch wird der Einsatz von siRNAs als Therapeutika derzeit getestet.

Die Herunterregulation der Genexpression mittels RNA Interferenz hat sich als eine sinnvolle Technik zur Analyse von Genfunktionen herausgestellt.

Synthetische siRNAs der Länge 21 bis 22 Basenpaare sind in Säugerzellen zum gezielten Stilllegen von Genen genutzt worden, um dann eine Loss of function Analyse durchzuführen (Elbashir et al. 2001; Brummelkamp et al. 2002).

Nicht alle mit den derzeit gängigen Algorithmen hergestellten siRNAs induzieren jedoch eine effiziente Inaktivierung der Genfunktion. Vielmehr muss die Effizienz einer siRNA in Bezug auf das Stilllegen ihres individuellen Zielgens bestimmt werden, um signifikante Schlüsse ziehen zu können. Um die Wahrscheinlichkeit einer effizienten siRNA zu erhöhen, wurden unterschiedliche siRNAs, die gegen das gleiche Zielgen gerichtet sind, getestet. In neueren Studien stellte sich heraus, dass siRNAs möglicherweise auch zu einer Inaktivierung von nicht verwandten Genen führen können (Jackson et al. 2003).

Eine weitere potenzielle Schwierigkeit bei der Verwendung der RNA Interferenz für Genfunktionsanalysen stellt die Induktion einer Interferonantwort dar. So resultiert die Transfektion mit siRNAs in einer Interferon-vermittelten Aktivierung des Jak-Stat Signalwegs und in einer Hochregulation IFN-stimulierter Gene. Dieser Effekt wird über die dsRNA-abhängige Proteinkinase PKR vermittelt, die durch 21 bp lange siRNAs aktiviert wird und für die Hochregulation von IFN- $\beta$  verantwortlich ist. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass der Mechanismus der RNA Interferenz selbst unabhängig vom Interferonsystem ist und spezifische Komponenten von siRNAs für die Interferonantwort ursächlich sind (Sledz et al. 2003).

### **1.4 Inaktivierung von HDGF durch RNA Interferenz**

Zhang et al. gelang es in einer 2006 veröffentlichten Studie, die Expression von HDGF in NSCLC durch Transfektion mit einer HDGF-spezifischen siRNA herunterzuregulieren. In Genexpressionsanalysen konnte eine Herunterregulation der HDGF-Expression um mehr als das 4-fache gegenüber den Kontrollzellen nachgewiesen werden. Die partielle Inaktivierung von HDGF hatte auf das anchorage-dependent Wachstum von NSCLC-Zellen kaum Einfluss, führte jedoch zu einer Reduzierung des anchorage-independent Wachstums von NSCLC-Zellen. Auch die Invasionsfähigkeit von NSCLC-Zellen

sowie die Bildung von Blutgefäßen in den Tumoren zeigten sich durch die Herunterregulation von HDGF beeinträchtigt. Bei den mit HDGF-siRNA behandelten Zellen war auch die Expression von 15 anderen Genen um mindestens das 2-fache niedriger als bei den Kontrollzellen, während bei keinem der Gene die Expression um mehr als das 2-fache erhöht war (Zhang et al. 2006).

### **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Das kolorektale Karzinom stellt einen der häufigsten Tumore der westlichen Industriestaaten dar. Aufgrund Knudsons „two-hit-hypothesis“ und der gemeinhin anerkannten Adenom-Karzinom-Sequenz (Vogelstein et al. 1988) konzentriert sich die Forschung der letzten Jahre vor allem auf die Tumorsuppressorgene. Deutlich geringer ist hier der Forschungsanteil bezüglich der Bedeutung von Onkogenen. Erste Vergleiche der Genexpressionsanalysen zwischen Zelllinien des kolorektalen Karzinoms und korrespondierender Normalmukosa deuten auf eine Bedeutung von HDGF als putatives Onkogen hin. Diese Arbeit dient der weiteren Erforschung der Bedeutung des putativen Onkogens HDGF in der Kolonkarzinogenese. Die Expression von HDGF in humanen Kolonkarzinomzellen soll mittels RNA Interferenz supprimiert werden. Zwei unterschiedliche, für HDGF spezifische siRNAs werden hierzu jeweils in einen Plasmidvektor kloniert. Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HT29 werden sowohl transient als auch stabil mit diesem Vektor transfiziert. Die Expression von HDGF in den transfizierten Zellen wird mittels Realtime-PCR quantifiziert und mit der Expression in mit Lipofektamin behandelten Zellen verglichen. Eine Genexpressionsanalyse soll den Erfolg der partiellen Inaktivierung von HDGF bestätigen. Die Effizienz der beiden eingesetzten siRNAs bezüglich der Expressionsreduktion von HDGF wird verglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Akku- Pipette „accu-jet“	Brand, Wertheim
Bakterienschüttler Certomat	B. Braun GmbH, Melsungen
CO <sub>2</sub> Brutschrank „Hera cell“	Heraeus, Hanau
Elektrophoresegerät „power pac 300“	BioRad, München
Elektrophoresekammer „mini trans blot“	BioRad, München
Gefrierschrank -80 °C	Forma Scientific, Marietta, USA
Heizmagnetrührer „Ikamag Reo“	IKA-Labortechnik, Staufen
iCycler	BioRad, München
Kühlzentrifuge „Laborfuge 400R“	Heraeus, Hanau
Lötkolben	Noras, Würzburg
Mikroskop „Leitz DM IL“	Leica, Bensheim
Mikrowelle	AFK, Düsseldorf
Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt
Ph-Meter	InoLab, WTW, Weilheim
RNA Abzug	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Sequenzierer „CEQ 8000“	Beckman Coulter, Krefeld
Sterilwerkbank „Hera safe“	Heraeus, Hanau
Tischkühlzentrifuge „Biofuge fresco“	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
UV-Photometer „Ultrospec 2100pro“	Amersham Biosciences, Freiburg
Vakuum-Maschine „Mini-Vac E1“	Axon Lab AG, Reichenbach/Stuttgart
Vortexer „MS2 Minishaker“	IKA Labortechnik, Staufen
Waage	Sartorius, Göttingen

Wasserbad	GFL, Burgwedel
Neubauer Zellzählkammer	Noras, Würzburg

Tab. 2: Geräte

### 2.1.2 Chemikalien

100bp DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
1kb DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Hefeextrakt	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Trypton	Sigma, Deisenhofen
Beta-Mercapto	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
FBS	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
HEPES Buffer	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
human GAPDH	Applied Biosystems, Darmstadt
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
Ladepuffer „Gel Loading Solution“	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Lipofektamin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
MEM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Mineral Oil	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt

NEAA	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
OptiMEM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Pen-Strep	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
peqGOLD Trifast	peqLab, Erlangen
Puromycin	Sigma, Deisenhofen
TrisBase	Calbiochem/Merck (Darmstadt)
Trypsin/EDTA	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Tryptanblau	Sigma, Deisenhofen

Tab. 3: Chemikalien

### 2.1.3 Enzyme und Puffer

BamH I	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
EcoRI	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Hind III	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
NEBuffer 2	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
ExoSAP-IT	USB Europe GmbH, Staufen
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
10*T4 DNA Ligase Puffer	New England Biolabs, Frankfurt a. M.

Tab. 4: Enzyme und Puffer

### 2.1.4 Fertigsätze

ABsolute Q PCR Mix	ABgene, Hamburg
Genome Lab DTCS Quick Start Kit	Beckman Coulter, Krefeld
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
Human Genome U133 Plus 2.0 Array	Affymetrix, Santa Clara, USA
iScript cDNA Synthesis Kit	BioRad, München

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RNase Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

Tab. 5: Fertigsätze

### 2.1.5 Standardlösungen

10* TBE	54,5 g TrisBase 27,5 g Borsäure 20,0 ml EDTA pH 8 mit H <sub>2</sub> O auf 500 ml aufgefüllt
Ampicillin	100 mg/ml in destilliertem H <sub>2</sub> O gelöst
Puromycin	10 mg/ml in destilliertem H <sub>2</sub> O gelöst

Tab. 6: Standardlösungen

### 2.1.6 Bakterien

NEB 5-alpha Competent E. coli	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
NEB Turbo Competent E. coli	New England Biolabs, Frankfurt a. M.

Tab. 7: Bakterien

### 2.1.7 Medien für Bakterien

LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl in 800 ml dest. H <sub>2</sub> O, der pH auf 7,5 eingestellt, auf 1 l mit dest. H <sub>2</sub> O aufgefüllt und autoklaviert
-----------	--

LB-Medium mit Ampicillin	dem LB-Medium wird Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) zugegeben
LB-Agaroseplatten mit Ampicillin	dem LB-Medium wird Agarose in einer Endkonzentration von 1,5 % zugesetzt, im Dampftopf autoklaviert und Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) zugegeben

Tab. 8: Medien für Bakterien

### 2.1.8 Eukaryontische Zelllinie

HT29 (kolorektale Karzinomzelllinie)	Kulturmedium 85,6 % MEM, 1 % L-Glutamin, 2 % Pen-Strep, 1 % NEAA, 0,4 % HEPES Buffer, 10 % FBS
---	---

Tab. 9: Eukaryontische Zelllinie

### 2.1.9 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der MWG Biotech AG, Ebersberg, hergestellt und geliefert. Der  $T_m$ -Wert stellt für einen definierten Doppelstrang die Temperatur dar, bei der 50 % der Doppelstränge als Einzelstränge vorliegen.

#### 2.1.9.1 siRNA-Inserts

Top-hdgr 2	$T_m > 75$ °C	63-mer
5'-GAT CCG GAG AAG TTT GGC AAG CCC TTC AAG AGA GGG CTT GCC AAA CTT CTC CTT TTT TGG AAA-3'		
Bottom-hdgr 2	$T_m > 75$ °C	65-mer
5'-AGC TTT TCC AAA AAA GGA GAA GTT TGG CAA GCC CTC TCT TGA AAG GGC TTG CCA AAC TTC TCC GG-3'		



### 2.1.9.2 Plasmidvektor

pSilencer™ puro Kit	Ambion, Darmstadt
1* DNA Annealing Solution GFP Control Insert pSilencer 3.1-H1 puro pSilencer 3.1-H1 puro Negative Control	

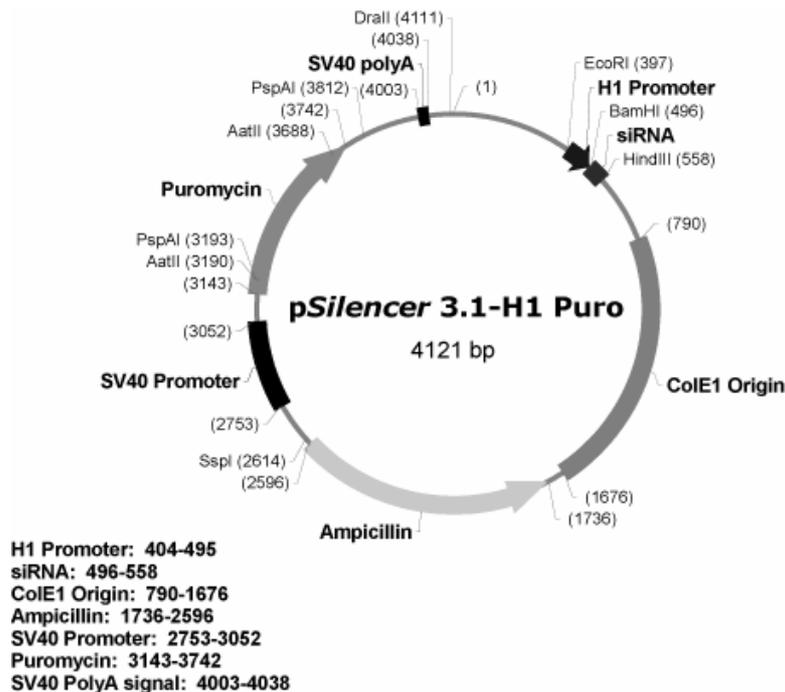


Abb. 4: Plasmidvektor pSilencer 3.1-H1 puro (Manual von Ambion)

Der Vektor pSilencer™ 3.1-H1 puro ist 4.121 bp lang. Er bedient sich eines H1 RNA-Polymerase III Promoters, der mit relativ einfachen Promoter- und Terminator- Sequenzen große Mengen kleiner RNA generiert. Der Vektor enthält zudem zwei Gene für Antibiotikaresistenzen. Das Ampicillin-Resistenz-Gen dient der Selektion in Bakterien, das Puromycin-Resistenz-Gen der Selektion in Säugerzellen. Der Vektor ist mit den Restriktionsenzymen BamH I und Hind III linearisiert, um direktionale Klonierung eines hairpin siRNA Inserts in den Vektor zu ermöglichen.

### 2.1.9.3 Primer für PCR und Sequenzierung

pSi3.1-F	$T_m$ 52,8 °C	17-mer
5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'		
pSi3.1-R	$T_m$ 57,9 °C	21-mer
5'-GAG TTA GCT CAC TCA TTA GGC-3'		

Tab. 11: Primer für PCR und Sequenzierung

### 2.1.9.4 Sonde und Primer für Realtime-PCR

probe HDGF RT	$T_m$ 76 °C	24-mer
5'-TTT CCC ACT CCA AGC CCA GCC CAT-3'		
sense HDGF RT	$T_m$ 68 °C	23-mer
5'-AAC CTG CTC TCC TCT TCT ACT CA-3'		
antisense HDGF RT	$T_m$ 68 °C	22-mer
5'-GGA GAA GAC ATG GCT CTG ACT C-3'		

Tab. 12: Sonde und Primer für Realtime-PCR

## 2.2 Molekularbiologische und molekulargenetische Methoden

### 2.2.1 Hybridisierung von DNA

Zwei komplementäre DNA-Einzelstränge werden nach folgendem Protokoll zu einem Doppelstrang hybridisiert:

Reaktionsansatz Hybridisierung		
2 $\mu$ l	Top-hdgf 2/4	(1 $\mu$ g/ $\mu$ l)
2 $\mu$ l	Bottom-hdgf 2/4	(1 $\mu$ g/ $\mu$ l)
46 $\mu$ l	1*DNA Annealing Solution	
<hr/>		
50 $\mu$ l	Gesamtvolumen	

Tab. 13: Reaktionsansatz Hybridisierung

Der Ansatz wird für 3 Minuten auf 90 °C erhitzt und dann für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Der entstandene Doppelstrang kann entweder direkt in einen Plasmidvektor ligiert oder bei -20 °C gelagert werden.

### 2.2.2 Ligation von DNA

Die hybridisierten Inserts werden nach folgendem Protokoll in einen Plasmidvektor ligiert:

Reaktionsansatz Ligation		
siRNA-Insert	Negativkontrolle	
1 $\mu$ l	- $\mu$ l	hybridisierte hdgf-siRNA (8 ng/ $\mu$ l)
- $\mu$ l	1 $\mu$ l	1*DNA Annealing Solution
6 $\mu$ l	6 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	10*T4 DNA Ligase Puffer
1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	Plasmidvektor
1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	T4 DNA Ligase (5 U/ $\mu$ l)
<hr/>		
10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	Gesamtvolumen

Tab. 14: Reaktionsansatz Ligation

Der Ansatz wird für 11 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation sollte zügig transformiert werden.

### **2.2.3 Transformation**

Zu einem entsprechenden Aliquot (200  $\mu$ l) kompetenter Bakterien wird die zu transformierende Plasmid-DNA (1-5  $\mu$ l) gegeben. Nach einer halbstündigen Inkubation auf Eis werden die Gefäße 30 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad inkubiert („Hitzeschock“) und anschließend für 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Zu dem Transformationsansatz werden 250  $\mu$ l eines für die Bakterien geeigneten Mediums gegeben und 60 Minuten bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Es werden einmal 9/10 und einmal 1/10 des Ansatzes (je mit LB-Medium auf 330  $\mu$ l gestreckt) auf mit Ampicillin versetzte, vorgewärmte LB-Medium-Agarose-Platten (Durchmesser 10 cm) verteilt und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Durch Auszählen der Bakterienkolonien (KBE) auf der mit 1/10 des Transformationsansatzes versetzten Platte kann unter Berücksichtigung der transformierten DNA-Menge die Transformationseffizienz in KBE/ $\mu$ g DNA ermittelt werden.

Ziel der Transformation ist die Einbringung des mit siRNA ligierten Plasmidvektors in die Bakterien. Durch die schnelle Bakterienvermehrung ist die Vermehrung des Plasmids leicht zu erreichen. Zum Nachweis der eingebrachten DNA kann eine Kolonie-PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese oder eine Minipräparation mit anschließendem Verdau und Agarosegelelektrophorese durchgeführt werden. Nach Isolation der DNA aus dem bakteriellen Genom mittels Maxipräparation werden Konzentration und Reinheit spektrometrisch bestimmt.

### **2.2.4 Kolonie-PCR**

Zum Nachweis des in den Vektor ligierten siRNA-Inserts werden in dieser Arbeit hauptsächlich Kolonie-PCRs durchgeführt. Es kommt das „HotStarTaq Master Mix Kit“ der Firma Qiagen zum Einsatz.

Reaktionsansatz Kolonie-PCR		PCR-Parameter	
1 $\mu$ l	Primer pSi3.1-F (10 pmol/ $\mu$ l)	15 min	95 °C
1 $\mu$ l	Primer pSi3.1-R (10 pmol/ $\mu$ l)	30 s	94 °C
12,5 $\mu$ l	HotStar Taq Master Mix	30 s	50 °C
10,5 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O	30 s	72 °C
<hr/>		10 min	72 °C
25 $\mu$ l	Gesamtvolumen	$\infty$	4 °C

Tab. 15: Reaktionsansatz Kolonie-PCR, PCR-Parameter

Es schließt sich eine Agarosegelelektrophorese zum Nachweis des in den Vektor ligierten siRNA-Inserts an.

### 2.2.5 Minipräparation

Die Minipräparation wird mithilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kits“ der Firma Qiagen durchgeführt.

Über Nacht wird eine Flüssigkultur (3 ml) der entsprechenden die Plasmid-DNA enthaltenden Bakterien mit Ampicillinzusatz (100  $\mu$ g/ml) bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. 2 ml der Kultur werden in ein neues Gefäß überführt und 10 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird in 250  $\mu$ l P1-Puffer resuspendiert, 250  $\mu$ l P2-Puffer zugegeben und der Ansatz nach Zugabe von 350  $\mu$ l N3-Puffer 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird auf eine QIAprep Säule aufgetragen und diese eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Nun wird die Säule mit 750  $\mu$ l PE-Puffer und einer erneuten einminütigen Zentrifugation bei 13000 rpm gewaschen. Die DNA wird mit 30  $\mu$ l Wasser und Zentrifugation für eine Minute bei 13000 rpm in ein 1,5 ml Gefäß eluiert.

An die Minipräparation schließen sich der Verdau der präparierten DNA und eine Agarosegelelektrophorese zum Nachweis des in den Vektor ligierten siRNA-Inserts an.

### 2.2.6 Verdau

Die in der Minipräparation aufgearbeitete DNA wird verdaut, um den Erfolg der Klonierung nachweisbar zu machen. In dieser Arbeit findet ein Doppelverdau mit zwei Restriktionsenzymen statt.

Reaktionsansatz Doppelverdau		
2 $\mu$ l		NEBuffer 2, 10*konzentriert
1 $\mu$ l		Restriktionsenzym Bam HI
1 $\mu$ l		Restriktionsenzym Hind III
15 $\mu$ l		DNA (Eluat der Minipräparation)
1 $\mu$ l		H <sub>2</sub> O
<hr/>		
20 $\mu$ l		Gesamtvolumen

Tab. 16: Reaktionsansatz Doppelverdau

Der Ansatz wird für mindestens eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend folgt eine Agarosegelelektrophorese zum Nachweis des siRNA-Inserts.

### 2.2.7 Agarosegelelektrophorese

Die bei der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen entstandenen DNA-Fragmente werden auf Agarosegelen analysiert. Dazu wird die Agarose in 1 x TBE-Puffer durch Erhitzen gelöst und nach dem Abkühlen auf ca. 55 °C mit Ethidiumbromid (0,5  $\mu$ g/ml Endkonzentration) versetzt. Die gelöste Agarose wird in einen Träger gegossen und der Kamm für die Probetaschen eingesetzt. Nach dem Erstarren des Gels auf einer horizontalen Fläche entfernt man den Kamm, trägt die mit 1/6 Vol. Probenpuffer versetzten Proben auf und trennt sie bei 6 V / cm Elektrodenabstand. Die DNA-Banden lassen sich aufgrund der Interaktion von Ethidiumbromid mit der DNA bei UV-Licht (312 nm) visualisieren. In dieser Arbeit finden hauptsächlich Agarosegele mit Konzentrationen von 2 % Verwendung.

Agarosekonzentration im Gel [%]	effiziente Auftrennung von Fragmenten folgender Größe [bp]
0,6	1000 - 20000
0,8	800 - 10000
1,0	400 - 8000
1,2	300 - 7000
1,5	200 - 4000
2,0	100 - 3000
3,0	50 - 700

Tab. 17: Agarosegelelektrophorese

### 2.2.8 Maxipräparation

Für die Maxipräparation kommt das „HiSpeed Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen zum Einsatz.

Zuerst wird eine 200 ml Kultur der die gewünschte Plasmid-DNA enthaltenden Bakterien mit Ampicillinzusatz (100 µg/ml) angesetzt und für ungefähr 8 Stunden bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Dann zentrifugiert man die Kultur 15 Minuten bei 6000 rpm und resuspendiert das Bakterienpellet in 10 ml P1-Puffer. Dazu werden 10 ml P2-Puffer gegeben, der Ansatz 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 ml gekühlter P3-Puffer zugesetzt. Das Lysat wird in den Lauf der QIAfilter Cartridge gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wird der Ansatz in die vorher mit 10 ml QBT-Puffer equilibrierte QIAGEN- HiSpeed Maxi Tip Säule filtriert. Es folgt ein Waschschrift mit 60 ml QC-Puffer sowie die Elution mit 15 ml QF-Puffer. Das Eluat wird mit 10,5 ml (0,7 Vol) Isopropanol versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Eluat-Isopropanol-Mischung wird in eine 30 ml Spritze gegeben und unter konstantem Druck durch den QIAprecipitator, der vorher an der Spritze befestigt wurde, filtriert. Die DNA wird gewaschen, indem unter konstantem Druck 2 ml Ethanol (70 %) durch den QIAprecipitator gepresst werden. Die Membran wird dann durch zweimaliges Hindurchpressen

von Luft getrocknet. Das restliche Ethanol an der Düse des QIAprecipitators wird mit absorbierendem Papier entfernt. Der QIAprecipitator wird an einer 5 ml Spritze befestigt und die DNA durch Zugabe von 1 ml TE-Puffer in ein 1,5 ml Gefäß eluiert. Das Eluat wird dann noch einmal in die gleiche Spritze gegeben und ein zweites Mal in das 1,5 ml Gefäß eluiert.

Die DNA-Konzentration wird mit Hilfe des UV-Photometers „Ultrospec 2100pro“ bestimmt. Die Ausbeute beträgt bis zu 500 µg. Die DNA kann mit Hilfe einer geeigneten Restriktionsspaltung auf einem Agarosegel kontrolliert werden.

### **2.2.9 Nukleinsäure-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung**

Zur spektrometrischen Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration kommt das UV-Photometer „Ultrospec 2100pro“ der Firma Amersham Biosciences unter Einsatz einer 100 µl Quarzküvette zur Anwendung. Die DNA bzw. RNA wird im Verhältnis 1:100 verdünnt, dann luftblasenfrei in die Küvette pipettiert und simultan bei 260 und 280 nm gemessen. Bei entsprechender Programmierung liefert das Gerät automatisch folgende Ergebnisse: die  $OD_{260}$ , die  $OD_{280}$ , die Konzentration und den Reinheitsfaktor. Dabei entspricht eine  $OD_{260}$  von 1 ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA oder 37 µg/ml einzelsträngiger DNA. Aus dem Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  ergibt sich die Reinheit der DNA bzw. RNA. Bei reiner DNA-Lösung liegt der Faktor bei 1,8. Liegt der gemessene Wert darüber, so ist das ein Hinweis auf eine mögliche Verunreinigung durch RNA. Liegt der gemessene Wert darunter, so ist dies ein Indiz für eine mögliche Proteinkontamination und/oder für das Vorhandensein von organischen Lösungsmitteln. Auf reine RNA-Lösung weist ein Extinktionsverhältnis von 2,0 hin.

### **2.2.10 Sequenzierung**

Die Sequenzierung nach Sanger beruht auf dem Prinzip des Kettenabbruchs durch Didesoxynukleotide und erfolgt in dieser Arbeit durch Verwendung von fluoreszenzmarkierten ddNTPs mit Hilfe des „Genome Lab DTCS Quick Start Kits“ und des automatischen Sequenziergerätes CEQ der Firma Beckman Coulter.

Als Ausgangssubstrat für die Sequenzierung werden die Produkte der Kolonie-PCRs verwendet. Das Ziel der Sequenzierung ist der Nachweis des in den Plasmidvektor ligierten siRNA-Inserts.

Zunächst findet ein Verdau mit ExoSAP-IT<sup>®</sup> statt.

Reaktionsansatz Exosap-Verdau		PCR-Parameter	
8 µl	Kolonie-PCR-Produkt	15 min	37 °C
1 µl	ExoSAP-IT <sup>®</sup>	2 min	96 °C
<hr/>		∞	4 °C
9 µl	Gesamtvolumen		

Tab. 18: Reaktionsansatz Exosap-Verdau, PCR-Parameter

Nach dem Verdau mit ExoSAP-IT<sup>®</sup> findet die eigentliche Sequenzier-Reaktion statt. Mit dem Verdauprodukt werden 2 Proben angesetzt, eine mit Vorwärts- und eine mit Rückwärts- Primer.

Reaktionsansatz Sequenzier-Reaktion		PCR-Parameter	
2 µl	Verdauprodukt	30 s	96 °C
2 µl	Quick Start Mix	20 s	96 °C
5 µl	H <sub>2</sub> O	20 s	50 °C
1 µl	Primer ff/rw (10 pmol/µl)	40 s	65 °C
<hr/>		} 30 Zyklen	
10 µl	Gesamtvolumen		

Tab. 19: Reaktionsansatz Sequenzier-Reaktion, PCR-Parameter

Schließlich folgt eine Ethanol-Fällung.

Reaktionsansatz Ethanol-Fällung		
10	µl	H <sub>2</sub> O
2	µl	0,1 molares EDTA
2	µl	Natriumacetat 3 mol
1	µl	Glycogen
<hr/>		
15	µl	Gesamtvolumen

Tab. 20: Reaktionsansatz Ethanol-Fällung

Diese 15 µl werden zu den 10 µl PCR-Produkt der Sequenzier-Reaktion gegeben. Nach Zugabe von 60 µl Ethanol (100 %, kalt) erfolgt eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 13000 rpm. Der Überstand wird abgekippt und nach Zugabe von 160 µl Ethanol (70 %, kalt) wird erneut 20 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstand werden die Proben kurz zum Austrocknen ins Dunkle gestellt.

Der Ansatz wird anschließend in 35 µl SLS aufgenommen und in eine Mikrotiterplatte gegeben. Auf jeden Ansatz kommt ein Tropfen Mineralöl. Nach Füllen einer Puffer-Platte kommen die Ansätze dann in den Sequenzierer.

Die Analyse der Rohdaten und die Auswertung der Sequenzen erfolgte in dieser Arbeit mit dem Computerprogramm CEQ der Firma Beckmann Coulter.

### 2.2.11 Realtime-PCR

Die Realtime-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, bietet jedoch zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung der Nukleinsäuren. Zur Quantifizierung dient ein Fluorophor-markiertes Oligonukleotid (Sonde), das im Bereich zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer bindet. Von dieser Sonde wird durch die Exonuklease-Funktion der DNA-Polymerase das Fluorophor abgespalten und somit räumlich von einem ebenfalls an der Sonde befindlichen „Quenchers“ getrennt. Im Normalzustand absorbiert der Quencher das von der

Sonde nach Anregung ausgesandte Licht. Nach räumlicher Trennung ist diese Absorption jedoch verhindert und es kommt zur Freisetzung von Fluoreszenzlicht, das dann detektiert werden kann. Die mit zunehmender Zyklenzahl freigesetzte Fluoreszenz steht in direkter Beziehung zur Menge der eingesetzten cDNA, die wiederum aus den Zellen des Versuchs durch Reverse Transkription der isolierten Gesamt-RNA hergestellt wird. Um Schwankungen der RNA-Präparation und der Effizienz der Reversen Transkription auszugleichen, wird ein Referenz-Gen (GAPDH) parallel zu den zu bestimmenden Transkripten mitbestimmt, welches durch die Versuchsbedingungen keinem Einfluss unterliegt. Bei den hier verwendeten Sonden handelt es sich um TaqMan-Sonden.

### **2.2.11.1 RNA-Präparation**

Alle Zentrifugationsschritte der RNA-Präparation erfolgen bei 4 °C und maximaler Drehzahl.

Für die Phasentrennung wird nach dem Auftauen jede Probe mit 0,2 ml Chloroform pro eingesetztem ml Trifast versetzt und für ca. 15 Sekunden mittels Vortexer vermischt. Die Proben werden dann für 3 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 5 Minuten zentrifugiert.

Dann folgt die Präzipitation der RNA. Die wässrige Phase des Ansatzes wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem ml Trifast versetzt und dann mittels Vortexer vermischt. Die Nukleinsäuren werden 5 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur gefällt und der Ansatz 10 Minuten zentrifugiert.

Als letzter Schritt der RNA-Präparation wird die RNA gewaschen und gelöst. Hierzu wird das Isopropanol vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und das Pellet in 1 ml Ethanol (75 %) in der Zentrifuge für 5 Minuten gewaschen. Dieser Schritt wird einmal wiederholt. Anschließend wird das Pellet für 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die gewaschene und gelöste RNA kann bei -80 °C eingefroren oder direkt aufgereinigt werden.

### **2.2.11.2      Aufreinigung und DNase-Behandlung**

Für diesen Schritt werden das „RNase Free DNase Set“ und das „RNeasy Mini Kit“ der Firma Qiagen verwendet.

Vorbereitend muss der Puffer RLT mit beta-Mercapto (10 µl/ml Puffer) und das Pufferkonzentrat RPE vor Erstgebrauch mit 4 Vol. Ethanol (100 %) versetzt werden. Die Zentrifugationsschritte für die Aufreinigung und DNase-Behandlung erfolgen bei 4 °C.

Der erste Schritt der Aufreinigung ist das Binden der RNA an Silica-Matrix. Zu den 100 µl RNA-Lösung der RNA-Präparation werden 350 µl Puffer RLT zugegeben, der Ansatz wird um 250 µl Ethanol (100 %) ergänzt und dann auf RNeasy-Säulen gegeben. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 10000 rpm wird das Eluat verworfen.

Beim DNase-Verdau werden 350 µl Puffer RW1 auf die RNeasy-Säule gegeben, 30 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert und das Eluat verworfen. Der 80 µl DNase-Mix, bestehend aus 10 µl DNase-Stammlösung und 70 µl Puffer RDD, wird auf die Fritte getropft und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden noch 350 µl Puffer RW1 zugegeben und eine Minute bei 10000 rpm zentrifugiert, das Eluat wird verworfen.

Die RNA wird nun gewaschen. Die RNeasy-Säule wird in ein neues 2 ml Gefäß gesetzt. Nach der Zugabe von 500 µl Puffer RPE erfolgt eine einminütige Zentrifugation bei 10000 rpm, das Eluat wird verworfen. Dieser Waschschrift wird einmal wiederholt. Die Säule wird nun durch zweimaliges Zentrifugieren bei 13000 rpm für jeweils zwei Minuten getrocknet.

Zum Schluss wird das 2 ml Auffanggefäß mit dem Eluat verworfen. Die Säule wird in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß eingesetzt, mit 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O versetzt und dann zweimalig bei 13000 rpm für jeweils zwei Minuten zentrifugiert. Die gereinigte RNA kann mit Hilfe des UV-Photometers „Ultrospec 2100pro“ auf ihre Konzentration analysiert und anschließend bei -80 °C gelagert werden.

### 2.2.11.3 cDNA-Synthese

Für die Herstellung der cDNA wird das „iScript cDNA Synthesis Kit“ von BioRad verwendet.

Reaktionsansatz cDNA-Synthese		PCR-Parameter	
4 $\mu$ l	5x iScript Reaction Mix	5 min	25 °C
1 $\mu$ l	iScript RT	30 min	42 °C
x $\mu$ l	H <sub>2</sub> O	5 min	85 °C
x $\mu$ l	RNA (100 fg zu 1 $\mu$ g Gesamt-RNA)	$\infty$	4 °C
<hr/>			
20 $\mu$ l	Gesamtvolumen		

Tab. 21: Reaktionsansatz cDNA-Synthese, PCR-Parameter

Der Ansatz kann anschließend bei -20 °C gelagert werden.

### 2.2.11.4 Realtime-PCR

Für die eigentliche Realtime-PCR kommt der „Absolute Q PCR Mix“ der Firma ABgene zum Einsatz. Es werden zwei 96-Mikrotiterplatten vorbereitet, eine für den HDGF-Ansatz und eine für den GAPDH-Ansatz. Das GAPDH dient als Referenz-Gen und kann bei der Auswertung der Realtime-PCR zur relativen Quantifizierung herangezogen werden.

Reaktionsansatz HDGF Realtime-PCR		
12,5	µl	Universal Mastermix
0,2	µl	probe HDGF RT
0,2	µl	sense HDGF RT
0,2	µl	antisense HDGF RT
11,9	µl	H <sub>2</sub> O
<hr/>		
25	µl	Gesamtvolumen

Tab. 22: Reaktionsansatz HDGF Realtime-PCR

Reaktionsansatz GAPDH Realtime-PCR		
12,5	µl	Universal Mastermix
1,25	µl	human GAPDH
11,25	µl	H <sub>2</sub> O
<hr/>		
25	µl	Gesamtvolumen

Tab. 23: Reaktionsansatz GAPDH Realtime-PCR

Das Vorgehen ist für den HDGF- und den GAPDH- Ansatz gleich. Der Ansatz wird für jede cDNA-Probe 4-fach hergestellt. Zu 96 µl Reaktionsansatz werden 4 µl der cDNA gegeben (bzw. 4 µl Wasser für die NTC). Die Proben werden kurz mittels Vortexer vermischt und dann für 2 Minuten bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Pro Probe werden 3 Kavitäten einer 96-Mikrotiterplatte mit jeweils 25 µl Reaktionsansatz geladen.

Die 2 Platten werden mit Deckeln verschlossen, in Alufolie gewickelt und bei 4 °C aufbewahrt. Vor der Realtime-PCR werden die Platten noch einmal 2 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert.

### **2.2.12 Genexpressionsanalyse**

Die Genexpressionsanalysen wurden mit „HG U133 Plus 2.0 Oligonukleotid-arrays“ der Firma Affymetrix durchgeführt. Die Proben wurden entsprechend dem „Affymetrix Expression analysis technical manual“, erhältlich unter [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com), von der AG Rosenwald des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg prozessiert.

## **2.3 Zellkultur**

### **2.3.1 Kultivierung von HT29-Zellen**

Die HT29-Zellen werden in HT29-Medium kultiviert und mit einem 5 %-CO<sub>2</sub>/Luft-Gemisch begast. Die Zellen werden in einem begasbaren Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Alle 3 bis 4 Tage werden die Kulturen ausgedünnt.

### **2.3.2 Zytotoxizitätstest**

Zunächst werden die HT29-Zellen in einer 24-Mikrotiterplatte ausgesät. Sobald die Zellen hochgewachsen sind, wird HT29-Medium mit Puromycin-Konzentrationen von 0 - 20 µg/ml zugegeben. Die Zellen werden täglich beobachtet und der Versuch ist abgeschlossen, wenn die Puromycin-Konzentration ermittelt wurde, bei der die Zellen gerade tot sind.

### **2.3.3 Transfektion von Zellen**

Die Transfektion des mit HDGF-siRNA ligierten pSilencer 3.1-H1 puro wird mit der Lipofektionsmethode durchgeführt. Durch Zugabe von Lipofektamin zur DNA kommt es zur Liposomenbildung. Die DNA ist in einem Vesikel aus lipidhaltiger Doppelmembran eingeschlossen. Das Liposom bindet an die Zelloberfläche der Empfängerzelle und die DNA gelangt durch Fusion oder Endozytose in das Zellinnere der Empfängerzellen.

Bei der transienten Transfektion wird die transfizierte DNA in der Empfängerzelle extrachromosomal gelagert, sie wird nicht in das Genom der Empfängerzelle integriert. Deshalb kommt es zu keiner regelmäßigen Weitergabe der DNA an die nächste Zellgeneration. Die maximale Expression

des Plasmids ist nach ungefähr zwei Tagen erreicht, danach überwiegen die Zellen der nächsten Generation ohne eingebautes Plasmid und die Expression ist rückläufig.

Bei der stabilen Transfektion wird die transfizierte DNA dauerhaft in das Genom der Empfängerzelle integriert. Es kommt zu einer regelmäßigen Weitergabe der DNA an die nächste Zellgeneration. In den Plasmidvektor pSilencer 3.1-H1 puro ist eine Puromycin-Resistenz integriert, die die Selektionierung erfolgreich transfizierter Zellen erlaubt.

### **2.3.3.1 Transiente Transfektion**

HT29-Zellen werden in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen / 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche ausgesät. Nach 24 Stunden Kultur entspricht die Zellkonfluenz ca. 40-50 %. Die HT29-Zellen werden durch Lipofektion transfiziert, wobei eine modifizierte Methode von Felgner et al. verwendet wird.

In einem 2 ml Reaktionsgefäß werden 1,5 ml serumfreies Medium (OptiMEM) vorgelegt und 7,5 µg DNA zugegeben. In einem weiteren Reaktionsgefäß werden pro Ansatz 22,5 µl Lipofektamin mit 1,5 ml OptiMEM gemischt und tropfenweise und unter Schütteln zu dem DNA-Ansatz gegeben. Nach einer fünfzehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird das DNA/Lipofektamin-Gemisch auf die inzwischen dreimal mit OptiMEM (auf 37 °C erwärmt) gespülten HT29-Zellen gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wird die Transfektionslösung durch HT29-Medium ersetzt. Nach zwei Tagen Kultur wird das Medium abgenommen, die Zellen werden in 1 ml Trifast gelöst, geerntet und bei -80 °C gelagert.

Durch Bestimmung der HDGF-Konzentrationen nach Transfektion in den HT29-Zellen mittels Realtime-PCR kann der zelluläre Effekt der in den pSilencer 3.1-H1 puro ligierten HDGF-siRNA gemessen werden.

### **2.3.3.2 Stabile Transfektion**

Die Aussaat und Lipofektion der HT29-Zellen erfolgt analog zur transienten Transfektion (2.3.3.1). Die Zellen werden nach zweitägiger Kultivierung jedoch nicht geerntet, sondern es beginnt die Selektionierung mit puromycinhaltigem

HT29-Medium mit einer Konzentration des Antibiotikums von 3 µg/ml. Das Medium wird alle zwei Tage gewechselt, bis die Zellen größtenteils tot sind.

Nach 2-3 Wochen Inkubation im Brutschrank kann man einzelne resistente Zellklone erkennen, die folgenderweise subkloniert werden: Die 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen werden mit einem LötKolben eröffnet, die Zellen werden einmal mit Trypsin/EDTA gewaschen und auf die vorher markierten Zellklone werden sterile Zylinder platziert, die ein Durchmischen von Zellen verschiedener Klone verhindern. In jeden Zylinder werden 100 µl Trypsin/EDTA pipettiert und nach zehnminütiger Inkubation können die jetzt abgelösten Zellen aus den einzelnen Zylindern isoliert und zur weiteren Amplifikation auf 6-Kavitäten-Gewebekulturplatten transferiert werden. Nach einer letzten Amplifikation in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen werden die Zellen in 3 ml Trifast gelöst, geerntet und bei -80 °C gelagert.

Mittels Realtime-PCR wird der zelluläre Effekt der in den pSilencer 3.1-H1 puro ligierten HDGF-siRNA gemessen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung von hdgf-siRNA II/IV in den Plasmidvektor

Ziel der Klonierung war es, siRNA zur späteren Inaktivierung von HDGF in humanen Kolonkarzinomzellen in einen Plasmidvektor zu ligieren. Es wurden hierfür zwei siRNAs mit unterschiedlichen Sequenzen konstruiert, die beide den Wachstumsfaktor HDGF als Zielgen haben.

Zunächst wurden die komplementären DNA-Einzelstränge Top-hdgf 2 bzw. Top-hdgf 4 mit einer Länge von 63 bp und Bottom-hdgf 2 bzw. Bottom-hdgf 4 mit einer Länge von 65 bp zu jeweils einem Doppelstrang hybridisiert. Es wurden dabei Ausgangskonzentrationen der Einzelstränge von 2 µg/µl, 1 µg/µl, 0,1 µg/µl sowie 0,01 µg/µl verwendet, um die Ausgangskonzentration mit der besten Transformationseffizienz zu ermitteln. Der entstandene Doppelstrang wurde hdgf-siRNA II bzw. hdgf-siRNA IV genannt.

Der hybridisierte Doppelstrang hdgf-siRNA II bzw. hdgf-siRNA IV wurde im folgenden Schritt in den 4121 bp langen Plasmidvektor pSilencer 3.1-H1 puro zwischen die Restriktionsstellen BamH I und Hind III ligiert. Das entstandene Ligationsprodukt heißt pSilencer puro II bzw. pSilencer puro IV.

#### 3.2 Transformation von E.coli mit pSilencer puro II/IV

Für die hier dargestellten Ergebnisse (Tab. 24; Tab. 25) wurde der kompetente Bakterienstamm NEB Turbo Competent E. coli mit 4 µl des hergestellten Plasmidvektors pSilencer puro II bzw. pSilencer puro IV transformiert. Das Wachstum der Klone fand auf LB-Ampicillin-Platten (Durchmesser 10 cm) statt, um so eine Selektionierung der erfolgreich transformierten Klone, die im Plasmidvektor eine Ampicillin-Resistenz tragen, zu erhalten. Beim Auswerten der Transformationseffizienz wurde auch die Ausgangskonzentration der Einzelstränge berücksichtigt. Die Kontrollplatte stellt Bakterien dar, die mit dem Plasmidvektor ohne siRNA-Insert transformiert wurden. Die mit pSilencer puro II bzw. pSilencer puro IV transformierten E. coli sollten eine 2- bis 10-fach höhere Anzahl an KBE aufweisen als die E. coli der Kontrollplatte.

## Ergebnisse

Die Transformationseffizienz war bei der Transformation von *E. coli* mit pSilencer puro II (Tab. 24) bei einer Ausgangskonzentration der Einzelstränge Top- und Bottom-hdgg II von 0,01 µg/µl mit 4500 KBE/µg DNA am größten. Die mit pSilencer puro II transformierten Bakterienplatten weisen die 6- bis 47-fache Anzahl an KBE (normiert auf Anteil 1) der Kontrollplatte (Anteil 1) auf.

Bezeichnung	Ausgangskonzentration siRNA II [µg/µl]	eingesetzte Menge [µl]	Verdünnung auf LB-Platte [Faktor]	Menge Plasmid-DNA [µg]	KBE [absolut]	KBE [normiert]	Transformations-effizienz [KBE/µg]
siRNA II:2µg/µl;Anteil:0,1	2	4	0,1	0,800	20	200	25
siRNA II:2µg/µl;Anteil:0,9	2	4	0,9	7,200	120	133	17
siRNA II:1µg/µl;Anteil:0,1	1	4	0,1	0,400	90	900	225
siRNA II:1µg/µl;Anteil:0,9	1	4	0,9	3,600	516	573	143
siRNA II:0,1µg/µl;Anteil:0,1	0,1	4	0,1	0,040	62	620	1550
siRNA II:0,1µg/µl;Anteil:0,9	0,1	4	0,9	0,360	600	667	1667
siRNA II:0,01µg/µl;Anteil:0,1	0,01	4	0,1	0,004	18	180	4500
siRNA II:0,01µg/µl;Anteil:0,9	0,01	4	0,9	0,036	102	113	2833
Kontrollplatte	1	4	1	4,000	19	19	5

Tab. 24: Transformationseffizienz siRNA II

Auch bei der Transformation von *E. coli* mit pSilencer puro IV (Tab. 25) war die Transformationseffizienz bei einer Ausgangskonzentration der Einzelstränge Top- und Bottom-hdgg IV von 0,01 µg/µl mit 12.300 KBE/µg DNA am größten. Die mit pSilencer puro IV transformierten Bakterienplatten zeigen hier die 0,6-1,4-fache Anzahl an KBE (normiert auf Anteil 1) der Kontrollplatte (Anteil 1).

Bezeichnung	Ausgangskonzentration siRNA IV [µg/µl]	eingesetzte Menge [µl]	Verdünnung auf LB-Platte [Faktor]	Menge Plasmid-DNA [µg]	KBE [absolut]	KBE [normiert]	Transformations-effizienz [KBE/µg]
siRNA IV:2µg/µl;Anteil:0,1	2	4	0,1	0,800	24	240	30
siRNA IV:2µg/µl;Anteil:0,9	2	4	0,9	7,200	404	449	56
siRNA IV:1µg/µl;Anteil:0,1	1	4	0,1	0,400	54	540	135
siRNA IV:1µg/µl;Anteil:0,9	1	4	0,9	3,600	416	462	116
siRNA IV:0,1µg/µl;Anteil:0,1	0,1	4	0,1	0,040	26	260	650
siRNA IV:0,1µg/µl;Anteil:0,9	0,1	4	0,9	0,360	400	444	1111
siRNA IV:0,01µg/µl;Anteil:1	0,01	4	1	0,040	492	492	12300
Kontrollplatte	1	4	1	4,000	396	396	99

Tab. 25: Transformationseffizienz siRNA IV

### 3.3 Kolonie-PCR von Klonen mit pSilencer puro II/IV

Zum Nachweis der erfolgreichen Transformation von NEB Turbo Competent E. coli mit dem pSilencer puro II bzw. pSilencer puro IV wurden nach der Transformation Kolonie-PCRs an ausgewählten Klonen durchgeführt. Das erwartete Produkt hat eine Länge von 300 bp. Als Positivkontrolle kam hier der Plasmidvektor „pSilencer Negative Control“ zum Einsatz, dessen enthaltene siRNA etwa so lang ist wie die hdgf-siRNA II bzw. hdgf-siRNA IV und der kaum Homologien zu anderen bekannten Sequenzen aufweist. Die Positivkontrollen (Abb. 5, Abb. 6) wiesen erwartungsgemäß in der Gelelektrophorese Amplifikationsprodukte der Größe 300 bp auf. Die Gelelektrophorese der PCR-Produkte von mit pSilencer puro II (Abb. 5) und IV (Abb. 6) transformierten E. coli zeigte PCR-Produkte der Größe 300 bp sowie 900 bp. Erstere stellen die erwünschten Vektoren pSilencer puro II bzw. pSilencer puro IV dar. Bei den letzteren kam es zu einer Klonierung von drei siRNA Fragmenten.

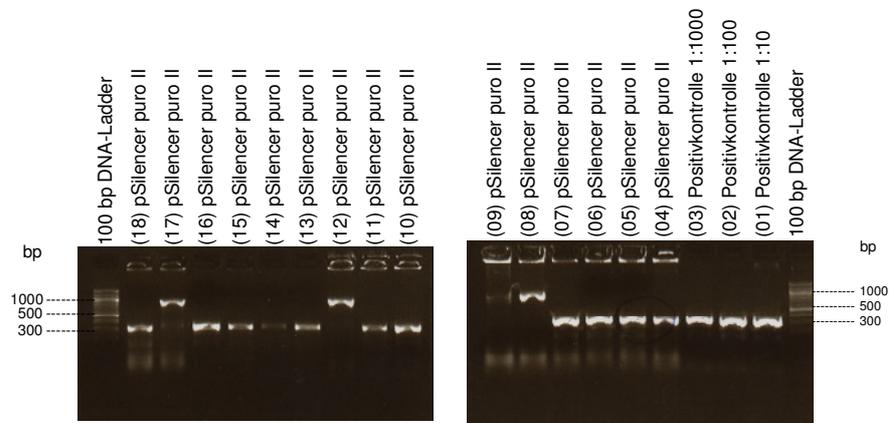


Abb. 5: Kolonie-PCR *hdgf-siRNA II*

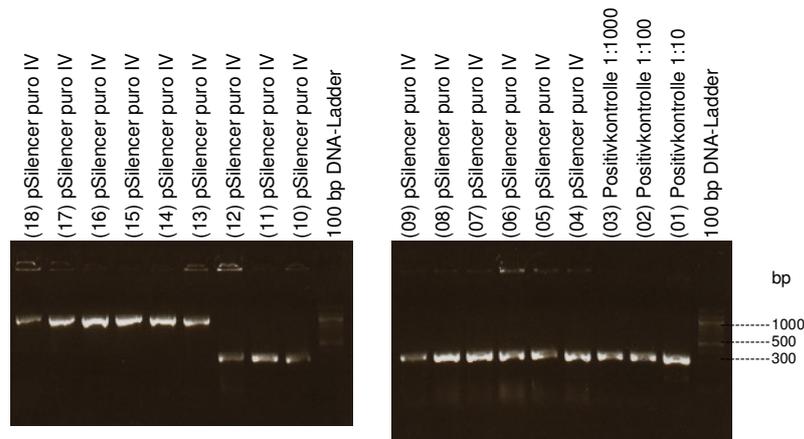


Abb. 6: Kolonie-PCR *hdgf-siRNA IV*

### 3.4 Maxipräparation von pSilencer puro II/IV

Zur Isolierung von pSilencer puro II bzw. pSilencer puro IV aus den NEB Turbo Competent E. coli sowie zur Aufbereitung der Plasmid-DNA für die Transfektion wurden Maxipräparationen durchgeführt. Die DNA-Konzentration der isolierten und aufbereiteten Plasmidvektoren wurde nach der Maxipräparation mit dem UV-Photometer bestimmt und lag beim pSilencer puro II bei 0,523  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  und beim pSilencer puro IV bei 2,721  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . In einem weiteren Schritt wurde mit den Produkten der Maxipräparation eine PCR nach dem Protokoll der Kolonie-PCR durchgeführt, um so den isolierten Plasmidvektor pSilencer puro II bzw. pSilencer puro IV nachzuweisen. Für die Gelelektrophorese wurden ein 2-prozentiges Gel sowie ein 100 bp DNA-Marker verwendet.

In der Gelelektrophorese der Maxipräparation von pSilencer puro II und pSilencer puro IV (Abb. 7) zeigten sich analog zu den vorherigen Gelen von Kolonie-PCR und Minipräparation DNA-Fragmente einer Größe von ungefähr 300 bp, so dass von einer erfolgreichen Durchführung der Maxipräparation ausgegangen werden kann.

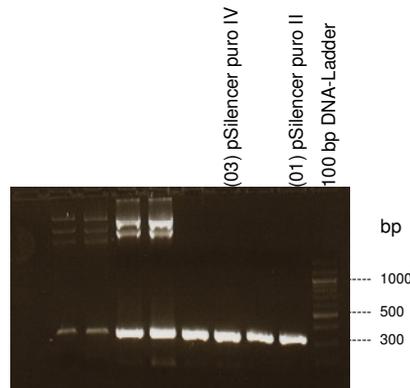


Abb. 7: Maxipräparation *hdgf-siRNA II* & *hdgf-siRNA IV*

### 3.5 Sequenzierung von *hdgf-siRNA II/IV*

Das Ziel der Sequenzierung war der Nachweis des in den Plasmidvektor pSilencer 3.1-H1 puro ligierten Inserts *hdgf-siRNA II* bzw. *hdgf-siRNA IV*.

Als Ausgangssubstrat für die Sequenzierung wurde hier (Abb. 8) zunächst das Kolonie-PCR-Produkt von einem der mit pSilencer puro II transformierten Klone verwendet. Der verwendete Klon ist die Probe „(05) pSilencer puro II“ aus Kapitel 3.3, bei dem eine 300er Bande in der Gelelektrophorese sichtbar war. Das Insert *hdgf-siRNA II* und die Anschlussstellen von Insert und Vektor sind hier durch den reverse Primer „02\_f\_psi“ abgebildet.

Codon Number:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										
Reference AA Translation:		C	M	R	P	L	G	S	G	E	V										
HDGF-siRNA2+etwas Vek...:		TGT	ATG	AGA	CCA	CTC	GGA	TCC	-GGA	GAA	GTT										
02_f_psi_0703:	AA	TGT	CTT	TGG	ATT	TGG	GAA	TCT	TAT	AAG	TTC										
02_r_psi_0703:		TGT	ATG	AGA	CCA	CTC	GGA	TCC	CGGA	GAA	GTT										
Difference:	11	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111										
Consensus:	AA	TGT	CTT	TGG	ATT	TGG	GAA	TCT	TAT	AAG	TTC										
Consensus AA Translation:		C	M	R	P	L	G	S	R	R	S										
Codon Number:	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29		
Reference AA Translation:	W	Q	A	L	Q	E	R	A	C	Q	T	S	P	F	L	E	K	L	G		
HDGF-siRNA2+etwas Vek...:	TGG	CAA	GCC	CTT	-CAA	GAG	AGG	GCT	TGC	CAA	-A-CT	TCT	CC-T	-TTT	TTG	GAA	AAG	CTT	GGC		
02_f_psi_0703:	TGG	CAA	GCC	CTT	TCAA	GAG	AGG	GCT	TGC	CAA	TAGCT	TCT	CCAT	GTTG	TTG	GAA	AAG	CTT	GGC		
02_r_psi_0703:	111	111	111	111	+111	111	111	111	111	111	+1+1	111	11+1	+11*	111	111	111	111	111		
Difference:	TGG	CAA	GCC	CTT	TCAA	GAG	AGG	GCT	TGC	CAA	TAGCT	TCT	CCAT	GTTG	TTG	GAA	AAG	CTT	GGC		
Consensus:		A	S	P	F	K	R	G	L	A	N	S	F	S	M	L	L	E	K		
Consensus AA Translation:		A	S	P	F	K	R	G	L	A	N	S	F	S	M	L	L	E	K		
Codon Number:	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	5
Reference AA Translation:	V	I	M																		
HDGF-siRNA2+etwas Vek...:	GTA	ATC	ATG	GT																	
02_f_psi_0703:	GTA	ATC	ATG	GTC	ATA	CGC	TGT	TTC	CAC	TGT	GTG	AAA	TTG	TTA	TCC	GCT	CAC	AAT	GAC	CAC	A
02_r_psi_0703:																					
Difference:	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	1
Consensus:	GTA	ATC	ATG	GTC	ATA	CGC	TGT	TTC	CAC	TGT	GTG	AAA	TTG	TTA	TCC	GCT	CAC	AAT	GAC	CAC	A
Consensus AA Translation:	V	I	M	V	I	R	C	F	H	C	V	K	L	L	S	A	H	N	D	H	T

Abb. 8: Sequenzierung *hdgf-siRNA II*

Weiteres Ausgangssubstrat war das Kolonie-PCR-Produkt von einem der mit pSilencer puro IV transformierten Klone (Abb. 9). Der verwendete Klon ist die Probe „(06) pSilencer puro IV“ aus Kapitel 3.3, bei dem eine 300er Bande in der Gelelektrophorese sichtbar war. Das hdgf-siRNA IV-Insert ist hier durch den forward Primer „009\_pSi\_R“ abgebildet. Ab der Loopsequenz (TTC AAG AGA) ist die Sequenzierung von Insert und Anschlussstelle hier korrekt, aufgrund der RNA-Struktur ist lediglich die vor dem Loop liegende Insertsequenz nicht auswertbar.

```

Codon Number:                1  2  3  4  5  6  7  8  9 10
Reference AA Translation:    V  X  D  H  S  D  P  E  R  X
HDGF-siRNA4+etwas Vek...:  GTA TGA GAC CAC TCG GAT CCG G--AG CGT TGA
009_pSi_F:
009_pSi_R:                   GA GGG AAG GGT GTG GGT GGG GGT AGG GGT GTG GGG GGG GTG TGG GTT GCG GGGGG GGT TTT
Difference:                  11 111 111 111 111 111 111 111 111 111 11* 1*1* 1** 1** 1*1 1*1 *11 1++1* 111 1**
Consensus:                   GA GGG AAG GGT GTG GGT GGG GGT AGG GGT GTG GGG GGG GTG TGG GTT GCG GGGGG GGT TTT
Consensus AA Translation:    V  G  G  V  W  V  A  G  G  V  F

Codon Number:                11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31
Reference AA Translation:    R  G  E  F  K  R  L  S  S  S  T  L  L  F  W  K  S  L  A  X  S
HDGF-siRNA4+etwas Vek...:  AGA GGA GAG TTC AAG AGA CTC TCC TCT TCA ACG CTC CTT TTT TGG AAA AGC TTG GCG TAA TCA
009_pSi_F:
009_pSi_R:                   TTT TG- GGG TTC AAG AGA CTC TCC TCT TCA ACG CTC CTT TTT TGG AAA AGC TTG GCG TAA TCA
Difference:                  *** 1- 1*1 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111
Consensus:                   TTT TG- GGG TTC AAG AGA CTC TCC TCT TCA ACG CTC CTT TTT TGG AAA AGC TTG GCG TAA TCA
Consensus AA Translation:    F  G  V  Q  E  T  L  L  F  N  A  P  F  L  E  K  L  G  V  I  M

Codon Number:                32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 5
Reference AA Translation:    W
HDGF-siRNA4+etwas Vek...:  TGG
009_pSi_F:
009_pSi_R:                   TGG TCA TAG CTG TTT CCT GTG TGA AAT TGT TAT CCG CTC ACA ATT CCA CAC AAC ATA CGT A
Difference:                  111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 1
Consensus:                   TGG TCA TAG CTG TTT CCT GTG TGA AAT TGT TAT CCG CTC ACA ATT CCA CAC AAC ATA CGT A
Consensus AA Translation:    V  I  A  V  S  C  V  K  L  L  S  A  H  N  S  T  Q  H  T  X
    
```

Abb. 9: Sequenzierung hdgf-siRNA IV

### 3.6 Zytotoxizitätstest der HT29-Zellen mit Puromycin

Die ermittelte Puromycin-Konzentration, bei der gerade alle HT29-Zellen tot sind, entspricht 3 µg/ml. Die Selektionierung bei der stabilen Transfektion wurde mit dieser ermittelten Puromycin-Konzentration durchgeführt.

### 3.7 Transfektion von HT29 mit pSilencer puro II/IV

Der hergestellte Plasmidvektor pSilencer puro II bzw. pSilencer puro IV wurde in die humane Kolonkarzinomzelllinie HT29 transfiziert, damit dort die in den Vektor ligierte hdgf-siRNA II bzw. hdgf-siRNA IV mittels RNA Interferenz zu einer Inaktivierung („gene silencing“) des Wachstumsfaktors HDGF auf mRNA-Ebene führt. Die Plasmid-DNA wurde einmal transient und einmal stabil per Lipofektion in die HT29-Zellen transfiziert.

### 3.7.1 Transiente Transfektion von HT29 mit pSilencer puro II/IV

Für die transiente Lipofektion von HT29 mit pSilencer puro II bzw. pSilencer puro IV wurden jeweils drei HT29-Zellreihen parallel mit dem Plasmidvektor transfiziert. Drei weitere Zellreihen wurden hier als Referenz für die HDGF-Expression nur mit Lipofektamin behandelt. Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte dieser jeweils drei Zellreihen dar.

Verglichen mit der HDGF-Expression von nicht behandelten HT29-Zellen („Medium“) sieht man hier (Abb. 10) bei den mit dem pSilencer puro II transfizierten HT29-Zellen eine relative HDGF-Expression von 67 %, die Transfektion hat zu einer Inaktivierung von HDGF um 33 % geführt.

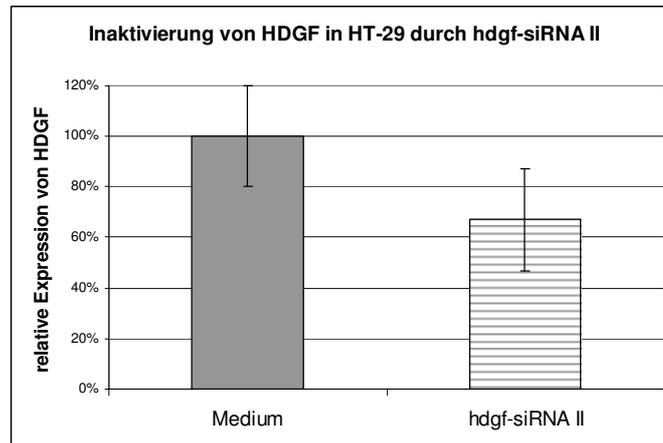


Abb. 10: HDGF-Inaktivierung durch hdgf-siRNA II (transiente Transfektion)

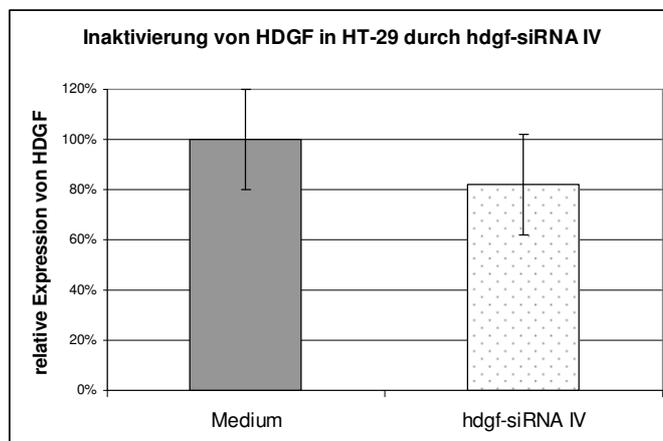


Abb. 11: HDGF-Inaktivierung durch hdgf-siRNA IV (transiente Transfektion)

Bei den mit dem pSilencer puro IV transfizierten HT29-Zellen (Abb. 11) sieht man verglichen mit der HDGF-Expression von nicht behandelten HT29-Zellen („Medium“) eine relative HDGF-Expression von 82 %, die Transfektion hat folglich zu einer Inaktivierung von HDGF um 18 % geführt.

### 3.7.2 Stabile Transfektion von HT29 mit pSilencer puro II/IV

Für die stabile Lipofektion von HT29 mit pSilencer puro II bzw. pSilencer puro IV wurden mehrere HT29-Zellreihen parallel mit dem jeweiligen Plasmidvektor transfiziert. Die dargestellten Säulen von Abb. 12 und Abb. 13 zeigen die relative HDGF-Expression von jeweils einer der transfizierten Zellreihen. Drei weitere Zellreihen wurden als Referenz für die HDGF-Expression nur mit Lipofektamin behandelt und in der graphischen Darstellung als Mittelwert abgebildet.

Bei den stabil mit dem pSilencer puro II transfizierten HT29-Zellen (Abb. 12) ist die Expression von HDGF für drei Zellklone herunterreguliert auf 18 %, 51 % und 21 %. Bei einem Zellklon ist die HDGF-Expression gesteigert.

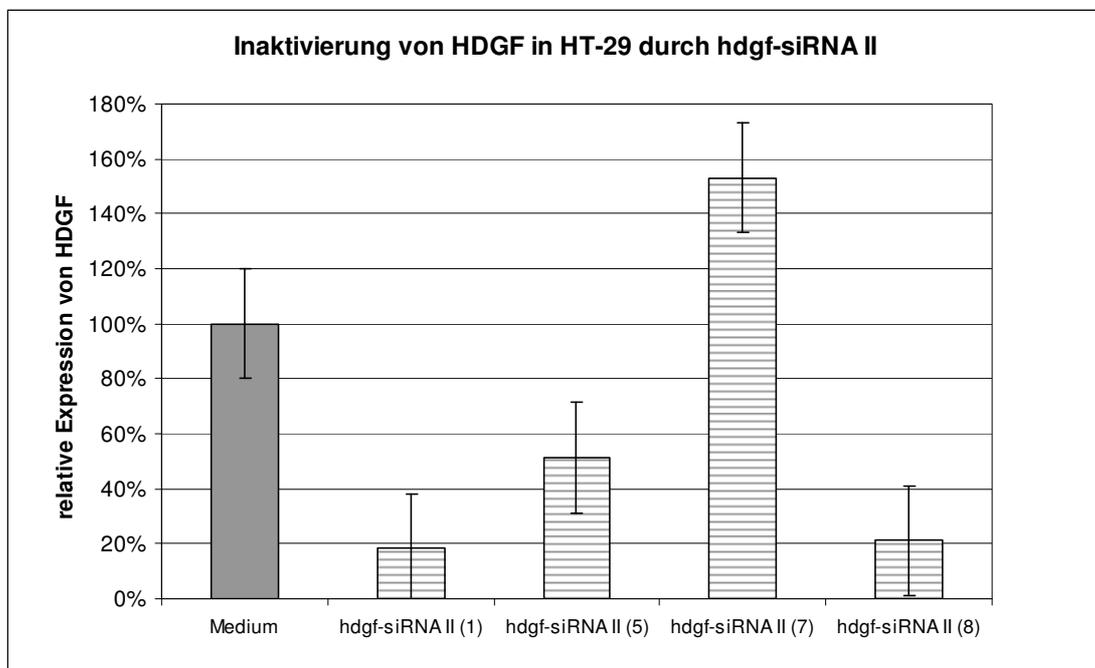


Abb. 12: HDGF-Inaktivierung durch hdgf-siRNA II (stabile Transfektion)

Bei den stabil mit dem pSilencer puro IV transfizierten HT29-Zellen (Abb. 13) ist die Expression von HDGF für die Zellklone herunterreguliert auf 23 %, 46 %, 63 %, 25 % und 44 %. Ein Zellklon zeigt etwa die gleiche Expression wie die nicht behandelten HT29-Zellen („Medium“).

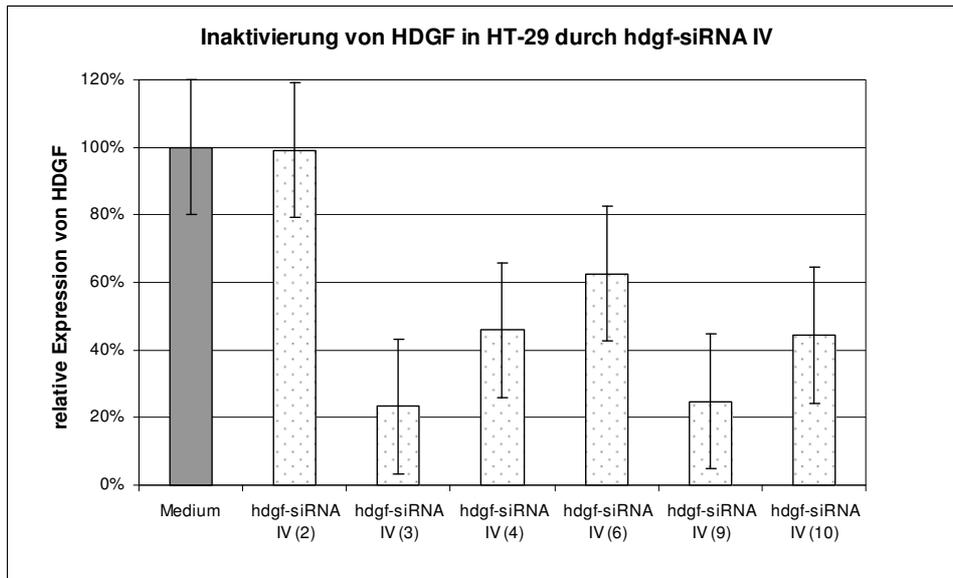


Abb. 13: HDGF-Inaktivierung durch hdgf-siRNA IV (stabile Transfektion)

### 3.8 Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse wurde mit „HG U133 Plus 2.0 Oligonukleotid-arrays“ der Firma Affymetrix durchgeführt. Es wurde extrahierte RNA aus den stabil mit hdgf-siRNA II bzw. hdgf-siRNA IV transfizierten HT29-Zellen sowie extrahierte RNA aus nur mit Lipofektamin behandelten HT29-Zellen verwendet, um deren Genexpression zu vergleichen.

Die gemittelte Expression von HDGF in den mit hdgf-siRNA II transfizierten HT29-Zellen war, verglichen mit den lediglich mit Lipofektamin behandelten Zellen, um den Faktor 4 herunterreguliert. HDGF belegte den Rang 206 sowie den Rang 353 der herunterregulierten Gene.

Ebenfalls stark herunterregulierte Gene der Genexpressionsanalyse waren hier unter anderem MAGE-A3, CXCR4 und CEACAM-5/6. MAGE-A3 (Melanoma Antigen Family A3) scheint eine wichtige Rolle bei verschiedenen Neoplasien

wie Leukämien, dem malignen Melanom, dem hepatozellulären Karzinom sowie beim kolorektalen Karzinom zu spielen (Guo et al. 2003; Martínez et al. 2007; Zhou et al. 2005; Kim et al. 2006). CXCR4 (Chemokine [C-X-C motif] Receptor 4) ist ein Chemokinrezeptor, der Schlüsselprozesse verschiedener neoplastischer Erkrankungen reguliert. So stellt die Expression von nukleärem CXCR4 einen prognostischen Marker für Lymphknotenmetastasen beim kolorektalen Karzinom dar und scheint auch die Entstehung von Mammakarzinomen durch unterschiedliche Mechanismen zu fördern (Yoshitake et al. 2008; Luker et al. 2005). Das karzinoembryonale Antigen Zelladhäsionsmolekül CEACAM ist Mitglied einer Gruppe von Glykoproteinen, die strukturell mit den Immunglobulinen verwandt sind. CEACAM-5 und CEACAM-6 sind in Vorstufen des kolorektalen Karzinoms überexprimiert und CEACAM-6 kann als unabhängiger prognostischer Marker bei Patienten mit kolorektalem Karzinom herangezogen werden (Jantscheff et al. 2003).

Gen	Genlokus	Faktor der veränderten Genexpression
MAGEA 3	Xq28	- 83
CXCR4	2q21.3	- 79
MAGE-A3	Xq28	- 74
AGR3	7p21.1	- 46
SYT13	11p11.2	- 36
AUTS2	7q11.22	- 34
MAGE-A12	Xq28	- 30
HIPK2	7q34	- 30
CXCR4	2q21.3	- 30
HIPK2	7q34	- 28
DKK1	10q21.1	- 27
C20orf56	20p11.21	- 25
ANXA13	8q24.13	- 25
HIPK2	7q34	- 24
CA2	8q21.2	- 24
CXCR4	2q21.3	- 21
GRB10	7p12.2	- 21

## Ergebnisse

---

FMNL2	2q23.3	- 21
C5orf13	5q22.1	- 20
DPP4	2q24.2	- 19
CEACAM5	19q13.2	- 18
CEACAM6	19q13.2	- 17
HDGF	1q23.1	- 4

Tab. 26: Genexpressionsanalyse *hdgf-siRNA II*; inaktivierte Gene

In den mit *hdgf-siRNA IV* transfizierten HT29-Zellen zeigte sich die gemittelte Expression von HDGF im Vergleich mit den lediglich mit Lipofektamin behandelten Zellen um den Faktor 9 herunterreguliert. HDGF belegte hier Rang 20 und Rang 23 der herunterregulierten Gene.

Hier war analog zur Transfektion der HT29-Zellen mit *hdgf-siRNA II* das Gen MAGE-A3 bedeutend herunterreguliert. Ein anderes Mitglied dieser Genfamilie, MAGE-A12, gehört ebenfalls zu den am stärksten herunterregulierten Genen. Dieses Mitglied der MAGE Genfamilie scheint ein zusätzlicher, nützlicher diagnostischer Marker für orale Plattenepithelkarzinome zu sein (Mollaoglu et al. 2008).

Gen	Genlokus	Faktor der veränderten Genexpression
MAGE-A3	Xq28	- 83
MAGE-A3	Xq28	- 74
MAGE-A12	Xq28	- 30
LOC2833352	12q24.32	- 18
LARP6	15q23	- 18
C20orf56	20p11.21	- 16
LOC283352	12q24.32	- 16
OR51E1	11p15.4	- 14
CNTNAP2	7q35	- 13
LEPREL1	3q28	- 12
CNTNAP2	7q35	- 11
ZNF738	19p12	- 11

## Ergebnisse

---

FGF9	13q12.11	- 10
CYP2B6	19q13.2	- 10
DMKN	19q13.12	- 10
SERPINA1	14q32.13	- 10
LOC723809	7q22.1	- 10
MAGEA2B	Xq28	- 10
HDGF	1q23.1	- 9
FXVD2	11q23.3	- 9
LAMB1	7q31.1	- 9
HDGF	1q23.1	- 8

Tab. 27: Genexpressionsanalyse *hdgf-siRNA IV*; inaktivierte Gene

Die Darstellung der durch die Transfektion mit *hdgf-siRNA IV* hochregulierten Gene zeigt eine Vielzahl von Interferonen, wie zum Beispiel IFI44L (Interferon-Induced Protein 44-like) und IFITM1 (Interferon-Induced Transmembrane Protein 1). RSAD2 (Radical S-Adenosyl methionine Domain containing 2) kodiert für ein im Zytoplasma lokalisiertes, antivirales Protein, das durch Interferone induziert wird.

Gen	Genlokus	Faktor der veränderten Genexpression
IFI44L	1p31.1	+ 141
IFITM1	11p15.5	+ 79
IFITM1	11p15.5	+ 68
IFI16	1q23.1	+ 57
IFI16	1q23.1	+ 52
RSAD2	2p25.2	+ 51
RSAD2	2p25.2	+ 46
TRIM22	11p15.4	+ 45
XAF1	17p13.2	+ 44
UBE2L6	11q12.1	+ 39

Tab. 28: Genexpressionsanalyse *hdgf-siRNA IV*: hochregulierte Gene

## **4 Diskussion**

### **4.1 Inaktivierung von HDGF durch RNA Interferenz**

#### **4.1.1 Inaktivierung von HDGF in Kolonkarzinomzelllinie HT29**

Die partielle Inaktivierung von HDGF in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 mittels RNA Interferenz gelang in dieser Arbeit sowohl durch Transfektion der HT29-Zellen mit der hdgf-siRNA II als auch durch Transfektion der Zellen mit der hdgf-siRNA IV. Während bei der transienten Transfektion nur eine Expressionsreduktion um 33 % (hdgf-siRNA II), bzw. 18 % (hdgf-siRNA IV) erreicht werden konnte, zeigte sich bei der stabilen Transfektion eine fast vollständige Inaktivierung mit einer Expressionsreduktion von 82 % (hdgf-siRNA II), bzw. 77 % (hdgf-siRNA IV). Diese mittels Real-Time-PCR ermittelten Daten, zeigten sich auch im cDNA-Array. Dabei zeigte sich eine 75-prozentige Expressionsreduktion bei hdgf-siRNAII, bzw. 87,5 % bei hdgf-siRNA IV.

#### **4.1.2 Auswirkungen der Inaktivierung von HDGF auf die Expression anderer Gene**

In dieser Arbeit ebenfalls stark herunterregulierte Gene der Genexpressionsanalyse waren unter anderem MAGE-A3 (Melanoma Antigen Family A3), CXCR4 (Chemokine [C-X-C motif] Receptor 4) und CEACAM-5/6 (karzinoembryonales Antigen), die hier beispielhaft diskutiert werden. Diesen Genen ist gemeinsam, dass sie beim kolorektalen Karzinom überexprimiert sind. Ihre Inaktivierung bzw. Herunterregulation könnte somit einen zusätzlichen inhibierenden Effekt auf das Wachstum des kolorektalen Karzinoms bewirken. Außerdem deutet die partielle Inaktivierung dieser Gene auf mögliche gemeinsame Signalwege bzw. eine Mitregulierung dieser Gene durch HDGF hin.

##### **4.1.2.1 CRCX4 und CXCL12**

Die Funktion des Rezeptors CXCR4 und seinem Ligand CXCL12 wurde im Jahr 2001 zunächst beim metastasierten Brustkrebs, in neueren Studien auch beim primären Mammakarzinom beschrieben (Luker et Luker 2006). Seither haben

verschiedene Studien das Chemokin CXCL12 und seinen Rezeptor als Schlüsselregulatoren von metastasierten und primären Mammakarzinomen etabliert. Die durch CXCR4 vermittelten Effekte scheinen die Entstehung von Mammakarzinomen über eine Vielzahl von Mechanismen zu begünstigen. Zu diesen Mechanismen zählen die Proliferation, das Überleben von Tumorzellen, die Angiogenese und Chemotaxis von Tumorzellen (Luker et Luker 2006).

Die Expression von CXCL12 und nukleärem CXCR4 stellt auch einen prognostischen Marker für das Auftreten von Lymphknotenmetastasen beim kolorektalen Karzinom dar. Yoshitake et al. zeigten 2008 für Patienten mit kolorektalem Karzinom, dass Patienten mit nukleärer Expression von CXCR4 signifikant regelmäßiger Lymphknotenmetastasen aufweisen als Patienten mit lediglich zytomembranöser CXCR4 Expression. Patienten mit nukleärer CXCR4 Expression der primären Läsion haben regelmäßig Zytomembran CXCR4 positive Lymphknotenmetastasen, schlechter differenzierte Tumoren sowie eine insgesamt schlechtere Prognose (Yoshitake et al. 2008).

CXCR4 ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der konstitutiv in vielen Geweben exprimiert wird, so zum Beispiel im Lymphgewebe, im Thymus, im Gehirn, in der Niere, im Magen und im Dünndarm (Nagasawa et al. 1994). Er ist auch in normalen Stammzellen verschiedener Gewebe exprimiert, zum Beispiel in Stammzellen des Brustgewebes (Dontu et al. 2003). Einziger Ligand von CXCR4 scheint das Chemokin CXCL12 zu sein (Horuk et al. 2001), das ebenfalls konstitutiv in vielen Geweben, zum Beispiel Lunge, Leber, Lymphknoten, Knochenmark und Nebennieren, exprimiert wird (Nagasawa et al. 1994; Muller et al. 2001; Phillips et al. 2003). Die Bindung von CXCL12 an seinen Rezeptor CXCR4 aktiviert intrazelluläre Signalwege und Effektormoleküle, die Überleben, Proliferation, Chemotaxis, Migration und Adhäsion von Zellen regulieren (Luker et Luker 2006).

### **4.1.2.2 CEACAM**

Die Glykoproteine CEACAM-6, CEACAM-1 und CEACAM-5 (CEA) sind physiologischerweise im kolorektalen Epithel koexprimiert, weisen im kolorektalen Karzinom aber eine dysregulierte Expression auf. Die

Überexprimierung von CEACAM-6 in hyperplastischen Polypen und frühen Adenomen des Kolons repräsentiert eine der am frühesten beobachtbaren molekularen Veränderungen, die zur Entstehung kolorektaler Karzinome führen. Die Expression von CEACAM-6 im kolorektalen Karzinom wurde als unabhängiger prognostischer Marker identifiziert, der die Einteilung der Patienten in eine High-risk oder Low-risk Gruppe ermöglicht. Ob CEACAM-5, CEACAM-6 und CEACAM-1 auch als prognostische Marker zur Evaluierung der Chemotherapie herangezogen werden können, bleibt unklar (Jantscheff et al. 2003).

Das Produkt des Gens CEACAM-5 (CEA) und ist durch sieben extrazelluläre Immunglobulin Domänen und einen Glykophosphatidylinositol Anker charakterisiert. CEA kommt physiologisch auf diversen Oberflächenepithelien vor. Es tritt unter anderem auf der Oberfläche des gastrointestinalen, des nasopharyngealen sowie des urogenitalen Epithels auf und kann auch auf den Epithelien der Schweißdrüsen nachgewiesen werden (Thompson et al. 1995). CEA kann homotype Bindungen mit sich selbst und heterotype Bindungen mit anderen CEACAM-Mitgliedern eingehen, so dass es einen Mediator der Zell-Zell-Adhäsion darstellt (Benchimol et al. 1989). Eine 10- bis 30-fache Überexpression von CEA (die auch in humanen Tumorzellen beobachtet werden kann) oder von CEACAM-6 scheint die geordnete Gewebearchitektur in 3D Zellkulturen von verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien durcheinander zu bringen (Ilantzis et al. 2002). Transgene Mäuse, die mehrere humane CEACAMs überexprimieren, weisen nach Azoxymethan Behandlung eine gesteigerte Bildung von Kolonkarzinomen auf (Chan et al. 2006). Die physiologische Funktion von CEA und seine potentielle Beteiligung bei der Tumorformation und dem Tumorwachstum sind noch nicht vollständig erschlossen.

Beim Menschen kennt man bislang die Proteine CEACAM-1, CEACAM-3, CEACAM-4, CEACAM-5, CEACAM-6, CEACAM-7 und CEACAM-8, die in zwei Gruppen unterteilt werden können. CEACAM-1, CEACAM-3 und CEACAM-4 sind mit einer Transmembrandomäne an das Zytoplasma angeschlossen. CEACAM-5, CEACAM-6, CEACAM-7 und CEACAM-8 sind durch

Glykophosphatidylinositol-Moleküle an Fettsäuren mit dem Zellinneren verbunden (Beauchemin et al. 1999).

### **4.1.2.3 MAGE**

Miyashiro et al. zeigten 2001, dass MAGE-A („Melanoma Antigen-Encoding Gene-A“) sowohl im Mammakarzinom als auch im kolorektalen Karzinom exprimiert wird, allerdings ist die Expression hier niedriger als beim Melanom. Park et al. fanden 2002 heraus, dass 42,1 % der untersuchten kolorektalen Karzinome in Korea MAGE-A1 bis MAGE-A6 exprimieren, am häufigsten schienen hier MAGE-A2 und MAGE-A4 exprimiert zu sein.

Für das Magenkarzinom, das Melanom und das hepatozelluläre Karzinom war berichtet worden, dass die MAGE-A1 und MAGE-A3 Expression mit einer Hypomethylierung der DNA in Zusammenhang gebracht werden kann (Kim et al. 2006). Die Mechanismen der Genexpression von MAGE im kolorektalen Karzinom war zunächst unklar, so dass Kim et al. 2006 untersuchten, ob es auch hier einen Zusammenhang mit einer erniedrigten genomischen Methylierung gibt. Von 32 untersuchten Zelllinien wiesen dabei jeweils 26 Zelllinien eine Hypomethylierung des Promoters von MAGE-A1 bzw. MAGE-A3 auf. Die Hypomethylierung der Promoter von MAGE-A1 und MAGE-A3 könnte eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und dem Fortschreiten humaner kolorektaler Karzinome spielen.

Die Genfamilie des „Melanoma Antigen-Encoding Gene“ (MAGE) setzt sich aus mindestens 4 Subfamilien (MAGE-A, B, C, und D) zusammen. Die gemeinsamen Merkmale dieser Gruppe sind die prädominante mRNA Expression in den Hoden, das Fehlen in anderen Geweben sowie die Genaktivierung und hohe mRNA Expression in verschiedenen Neoplasien (Park et al. 2002). Nur MAGE-D kommt nachweislich auch in gesundem Gewebe vor (Chomez et al. 2001). Die Genfamilie MAGE ist auf dem X-Chromosom lokalisiert. Sie wird von HLA-1 Molekülen präsentiert und von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt (Park et al. 2002).

Die bislang am besten charakterisierte und am häufigsten in Tumoren nachgewiesene Subfamilie ist MAGE-A. Auch diese Subfamilie besteht

wiederum aus mindestens 12 Mitgliedern, die in verschiedenen Tumoren sowie in gesunden männlichen Keimzellen und der Plazenta exprimiert wird.

Da die MAGE Genfamilie in normalem Gewebe (mit Ausnahme der Testes) nicht vorkommt, könnten diese Antigene ein nützliche Ziel für die spezifische Immuntherapie in der Onkologie sein.

#### **4.2 Unerwünschte Effekte der Inaktivierung von Genen mittels RNA Interferenz**

Die RNA Interferenz erweist sich als ein nützliches Instrument zur Determinierung von Genfunktionen und Stoffwechselwegen sowie zur bewussten Manipulation der Genexpression von Zellen. Hieraus resultieren sowohl eine wichtige Rolle in der Diagnostik von Erkrankungen als auch eine Bedeutung bezüglich Prognose, Therapieoptionen und Verlauf von unterschiedlichen Krankheitsbildern. Bei der Analysierung von Stoffwechselwegen und Genfunktionen sowie der Inaktivierung von Genen werden gezielt bestimmte Gene selektiert, deren Expression genau untersucht wird. Die weniger spezifischen Effekte der RNA Interferenz auf andere Gene werden hierbei meist vernachlässigt. Sie können jedoch weit reichende und komplizierende Effekte mit sich bringen, die über die gewünschte Wirkung der RNA Interferenz hinausgehen (Sledz et al. 2003). Ein solcher, über die erwünschte Wirkung der RNA Interferenz hinausgehender Effekt, ist die Aktivierung des Interferonsystems. Ein anderer, weniger spezifischer Effekt, ist die gleichzeitige Inaktivierung oder Hochregulation von Genen, die nicht das eigentliche Zielgen der RNA Interferenz darstellen.

Beispielhaft wird hier die Aktivierung des Interferonsystems durch RNAi beschrieben. Interferone sind Zytokine, die im menschlichen Körper als erste Abwehr gegen virale Erreger agieren. Da dsRNA eine typische virale Replikationsstufe darstellt, wird die Immunantwort mittels Interferonsystem zum Teil durch dsRNA getriggert. Die resultierende Signalkaskade wird über eine Reihe von Proteinen vermittelt, zu denen die Januskinasen Jak1 und Tyk2, die Signaltransduktoren und Transkriptionsaktivatoren Stat 1 und Stat 2 sowie der

Transkriptionsfaktor IRF9 gehören. Resultat dieser Kaskade ist die Induktion der ISGs (Interferon-Stimulated Genes) im Nukleus.

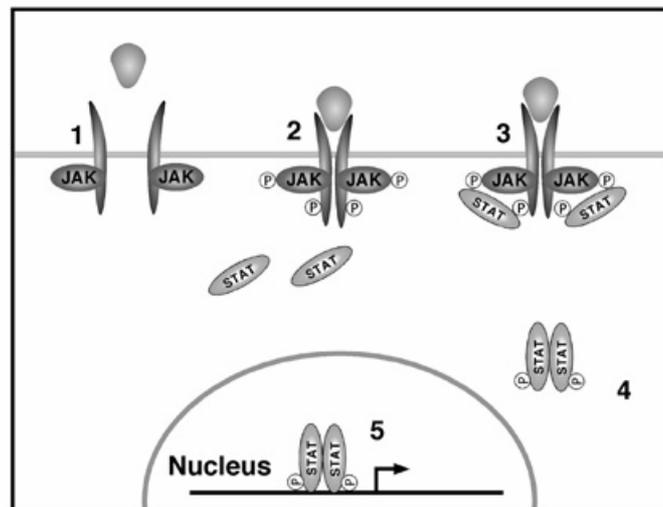


Abb. 14: Die Jak-Stat-Signalkaskade (Max-Planck-Institut)

Die Transfektion von Säugerzellen mit 21 bp langen dsRNAs führt nun ebenfalls zu einer Interferon-vermittelten Aktivierung des Jak-Stat-Signalweges. Sledz et al. bemerkten bei der Transfektion einer Glioblastomzelllinie mit einer für das Zielgen Laminin A/C entwickelten siRNA, dass nicht nur die Expression von Laminin A/C reduziert, sondern gleichzeitig die Expression von Stat 1 hochreguliert war. Diese Hochregulierung von Stat 1 konnte noch für sechs weitere siRNAs gezeigt werden. In weiteren Versuchen wurde nachgewiesen, dass Stat 1 nur eines von vielen Interferon-vermittelten, hochregulierten ISGs darstellt. Dieser Effekt wird über die Proteinkinase R vermittelt, die durch 21 bp lange RNAs aktiviert wird und für die Hochregulierung der Interferonantwort nötig ist. Die Induktion der ISG scheint spezifisch für die Anwesenheit von siRNAs zu sein, da in Kontrolltransfektionen unter Abwesenheit von siRNAs keine ISG Expression induziert werden konnte (Sledz et al. 2003).

### 4.3 Inaktivierung von HDGF in einer NSCLC-Zelllinie

Auch bei anderen Tumoren konnte bereits eine Inaktivierung von HDGF durchgeführt werden. Beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom wird HDGF

überexprimiert und der Expressionsgrad korreliert stark mit einem schlechten allgemeinen, krankheitsspezifischen und krankheitsfreien Überleben (Ren et al. 2004). Um die Mechanismen der HDGF-vermittelten Aggressivität der NSCLC aufzudecken, haben Zhang et al. 2006 die HDGF Expression in den NSCLC durch RNA Interferenz herunterreguliert und die Effekte dieser Herunterregulation auf die Zellproliferation und Invasion untersucht. Die Gruppe arbeitete mit verschiedenen erworbenen NSCLC Zelllinien und 2 unterschiedlichen, für HDGF spezifischen siRNAs. Die Transfektion mit HDGF-spezifischen siRNAs resultierte in einer Herunterregulation der HDGF Expression in vier NSCLC Zelllinien. Die mit HDGF-siRNA transfizierten Zellen wuchsen langsamer und bildeten weniger Kolonien als die lediglich mit Lipofektamin oder der Negativkontroll-siRNA behandelten Zellen. Die Invasion einer Membran als Barriere konnte in vitro durch deutlich weniger mit HDGF-siRNA transfizierte Zellen als durch mit Lipofektamin behandelte Zellen geleistet werden. In einem in vivo Nacktmausmodell wuchsen ebenfalls die mit HDGF-siRNA transfizierten Zellen signifikant langsamer als die mit Lipofektamin bzw. der Negativkontroll-siRNA behandelten Zellen. Morphologisch zeigten die mit HDGF-siRNA behandelten Tumore eine ausgesprochen reduzierte Ausbildung der Blutgefäße und erhöhte Nekrosen. Allerdings zeigte sich der Proliferationsindex (Ki67) in Tumoren, die mit der Kontrolle behandelt wurden, ähnlich. Zusammenfassend scheint HDGF im anchorage-unabhängigen Wachstum, der Zellinvasion sowie der Neovaskularisation von NSCLC eine Rolle zu spielen (Zhang et al. 2006).

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression des putativen Onkogens HDGF in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 mittels RNA Interferenz herunterreguliert. Zwei unterschiedliche, für das Zielgen HDGF spezifische siRNAs (hdgf-siRNA II; hdgf-siRNA IV) wurden hierzu jeweils in einen Plasmidvektor (pSilencer 3.1-H1 puro) kloniert. Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HT29 wurden zunächst transient und später stabil mit den beiden resultierenden Plasmidvektoren (pSilencer puro II; pSilencer puro IV) transfiziert, die Expression von HDGF in den transfizierten Zellen mittels Realtime-PCR quantifiziert und mit der Expression in mit Lipofektamin behandelten Kontrollzellen verglichen. Durch die stabile Transfektion beider Plasmidvektoren (pSilencer puro II; pSilencer puro IV) konnte die HDGF-Expression fast komplett supprimiert werden. Im Rahmen eines cDNA-Array konnten außer einer Expressionsverminderung von HDGF noch multiple Expressionsveränderungen anderer Gene identifiziert werden. Dies ist zum einen durch unspezifische, durch den Plasmidvektor bedingte Effekte erklärbar. Zum anderen aber ist die Deregulation vieler dieser Gene als Effekt der Inaktivierung von HDGF erklärbar. In weiteren Arbeiten müssen die identifizierten Genexpressionsänderungen mit Real-Time-PCR bestätigt werden und die entsprechenden Stoffwechselwege identifiziert werden. Dies könnte zur Aufklärung der Wirkungsweise von HDGF beitragen und eventuell zur Identifizierung von therapie relevanten Zielstrukturen führen.

## 6 Literaturverzeichnis

**Ahr B, Denizot M, Robert-Hebmann V, Brelot A, Biard-Piechaczyk** (2005). Identification of the cytoplasmatic domains of CXCR4 involved in Jak2 and STAT3 phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 280: 6692-6700

**Beauchemin N, Draber P, Dreksler G, et al.** (1999). Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Experimental Cell Research* 252(2):243-249.

**Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirota K, Stanners C** (1989). Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 57: 327-334

**Bernard K, Litman E, Fitzpatrick J, Shellman Y, Argast G, Polvinen K, Everett A, Fukasawa K, Norris D, Ahn N, and Resing K** (2003). Functional Proteomic Analysis of Melanoma Progression. *Cancer Research* 63: 6716-6725.

**Brummelkamp T, Bernards R, and Agami R** (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296 (5567): 550-553.

**Chan C, Cook D, Stanners C** (2006). Increased colon tumor susceptibility in azoxymethane treated CEABAC transgenic mice. *Carcinogenesis* 27(9): 1909-1916

**Chang L, Karin M** (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40

**Cheng Z, Zhao J, Sun Y, Hu W, Wu Y, Cen B, et al.** (2000). Beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 2479-2485

**Chomez P, De Backer O, Bertrand M, De Plaen E, Boon T, Lucas S** (2001). An Overview of the MAGE Gene Family with the Identification of All Human Members of the Family. *Cancer Research* 61: 5544-5551.

**Cilley E, Zgleszewski S, and Chinoy M** (2000). Fetal lung development: Airway Pressure Enhances the Expression of Developmental Genes. *Journal of Pediatric Surgery* 35: 113-119.

**Daneholt B** (2006). Advanced Information on the Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006. Nobelförsamlingen-The Nobel Assembly at Karolinska Institutet.

**Dontu G, Abdallah W, Foley J, Jackson K, Clarke M, Kawamura M, et al.** (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes & development* 17: 1253-1270

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

**Enomoto H, Yoshida K, Kishima Y, Kinoshita T, Yamamoto M, Everett A, Miyajima A, and Nakamura H** (2002). Hepatoma-Derived Growth Factor is highly Expressed in Developing Liver and Promotes Fetal Hepatocyte Proliferation. *Hepatology* 36: 1519-1527.

**Enomoto H, Yoshida K, Kishima Y, Okuda Y, and Nakamura H** (2002). Participation of hepatoma-derived growth factor in the regulation of fetal hepatocyte proliferation. *Journal of Gastroenterology* 37 Suppl 14: 158-161.

**Everett A** (2001). Identification, Cloning, and Developmental Expression of Hepatoma-Derived Growth Factor in the Developing Rat Heart. *Developmental Dynamics* 222: 450-458.

**Everett A, Lobe D, Matsumura M, Nakamura H, and McNamara C** (2000). Hepatoma-derived growth factor stimulates smooth muscle cell growth and is expressed in vascular development. *The Journal of Clinical Investigation* 105: 567-575.

**Everett A, Narron J, Stoops T, Nakamura H, and Tucker A** (2004). Hepatoma Derived Growth Factor is a Pulmonary Endothelial Cell Expressed Angiogenic Factor. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 286: L1194-1201.

**Everett A, Stoops T, and McNamara C** (2001). Nuclear Targeting Is Required for Hepatoma-Derived Growth Factor-stimulated Mitogenesis in Vascular Smooth Muscle Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 37564-37568.

**Fearon E, and Vogelstein B** (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.

**Fernandis A, Prasad A, Band H, Klosel H, Ganju R** ( 2004). Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells. *Oncogene* 23: 157-167

**Fernandiz A, Ganju R** (2001). Slit: a roadblock for chemotaxis. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* 91: PE1

**Folkman J** (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in Oncology* 29: 15-18

**Fresno Vara J, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M** (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews* 30: 193-204

**Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Robert Koch Institut** (2006). *Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends*. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe Saarbrücken 2006

**Grady W, and Markowitz S** (2002). Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 3: 101-128

**Guo J, Wen D, Huang R, Paul E, Wunsch P, Itakura E, Cochran A** (2003). Detection of multiple melanoma-associated markers in melanoma cell lines by RT in situ PCR. *Experimental and molecular pathology* 74(2): 140-147

**Hartmann T, Burger J, Glodek A, Fujii N, Burger M** ( 2005). CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer cells. *Oncogene* 24(27): 4462-4471

**Horuk R** (2001). Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Review* 12:313-335

**Hu T, Huang C, Liu L, Lin P, Liu S, Chang H, Changchien C, Lee C, Chuang J, and Tai M** (2003). Expression of Hepatoma-Derived Growth Factor in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer* 98: 1444-1456.

**Ikegame K, Yamamoto M, Kishima Y, Enomoto H, Yoshida K, Suemura M, Kishimoto T, and Nakamura H** (1999). A New Member of a Hepatoma-Derived Growth Factor Gene Family Can Translocate to the Nucleus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266: 81-87.

**Ilantzis C, DeMarte L, Screatton R, Stanners C.** (2002). Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM-6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia* 4: 151-163

**Iwasaki T, Nakagawa K, Nakamura H, Takada Y, Matsui K, Kawahara K** (2005). Hepatoma-derived growth factor as a prognostic marker in completely resected non-small-cell lung cancer. *Oncology Report* 13 (6): 1075-1080.

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

**Jantscheff P, Terracciano L, Lowy A, Glatz-Krieger K, Grunert F, Micheel B, Brümmer J, Laffer U, Metzger U, Herrmann R, Rochlitz C** (2003). Expression of CEACAM6 in Resectable Colorectal Cancer: A Factor of Independent Prognostic Significance. *Journal of Clinical Oncology* 21: 3638-3646

**Kambe H, Kishima Y, Kuroda T, Enomoto H, Ogawa H, and Nakamura H** (2000). Protein kinase C inhibitor, H-7 suppresses the growth activity of hepatoma-derived growth factor. *Hepatogastroenterology* 47 (36): 1645-1648.

**Kayali A, Van Gunst K, Campbell I, Stotland A, Krittzik M, Liu G, et al.** (2003). The stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 ligand-receptor axis is critical for progenitor survival and migration in the pancreas. *The Journal of Cell Biology* 163: 859-869

**Kim K, Choi J, Kim J, Ku J, Park J** (2006). Promoter hypomethylation and reactivation of MAGE-A1 and MAGE-A3 genes in colorectal cancer cell lines and cancer tissues. *World Journal of Gastroenterology* 12(35): 5651-5657

**Kishima Y, Yamamoto H, Izumoto Y, Yoshida K, Enomoto H, Yamamoto M, Kuroda T, Ito H, Yoshizaki K, and Nakamura H** (2002). Hepatoma-Derived Growth Factor Stimulates Cell Growth after Translocation to the Nucleus by Nuclear Localization Signals. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 10315-10322.

**Kuespert K, Pils S, Hauck C** (2006). CAECAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Current Opinion in Cell Biology* 18, 5: 565-571

**Kuroda T, Tanaka H, Nakamura H, Nishimune Y, and Kishimoto T** (1999). Hepatoma-Derived Growth Factor-Related Protein (HRP)-1 Gene in Spermatogenesis in Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262: 433-437.

**Lepourcelet M, Tou L, Cai L, Sawada J, Lazar A, Glickman J, Williamson J, Everett A, et al.** (2005). Insights into developmental mechanisms and cancers in the mammalian intestine derived from serial analysis of gene expression and study of the hepatoma-derived growth factor (HDGF). *Development* 132 (2): 415-27.

**Luker K, Luker G** (2006). Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Letters* 238: 30-41

**Luo J, Manning B, Cantley L** (2003). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 4: 257-262

**Machuy N, Thiede B, Rajalingam K, Dimmler C, Thieck O, Meyer T, and Rudel T** (2005). A Global Approach Combining Proteome Analysis and Phenotypic Screening with RNA Interference Yields Novel Apoptosis Regulators. *Molecular & Cellular Proteomics* 4.1: 44-55

**Martínez A, Olarte I, Mergold M, Gutiérrez M, Rozen E, Collazo J, Amancio-Chassin O, Ordóñez R, Montesinos J, Mayani H, McCurdy D, Ostrosky-**

**Wegman P, Garrido-Guerrero E, Miranda E** (2007). mRNA expression of MAGE-A3 gene in leukemia cells. *Leukemia research* 31(1): 33-37

**Matsuyama A, Inoue H, Shibuta K, Tanaka Y, Barnard G, Sugimachi K, and Mori M** (2001). Hepatoma-derived Growth Factor Is Associated with Reduced Sensitivity to Irradiation in Esophageal Cancer. *Cancer Research* 61: 5714-5717.

**Miyashiro I, Kuo C, Huynh K, Iida A, Morton D, Bilchik A, Giuliano A, Hooh D** (2001). Molecular Strategy for Detecting Metastatic Cancers with Use of Multiple Tumor-specific MAGE-A Genes. *Clinical Chemistry* 47:3.

**Mollaoglu N, Vairaktaris E, Nkenke E, Neukam F, Ries J** (2008). Expression of MAGE-A12 in oral squamous cell carcinoma. *Disease Markers* 24(1): 27-32.

**Mori M, Morishita H, Nakamura H, Matsuoka H, Yoshida K, Kishima Y, Zhou Z, Kida H, Funakoshi T, Goya S, et al.** (2004). Hepatoma-Derived Growth Factor Is Involved in Lung Remodeling by Stimulating Epithelial Growth. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 30: 459-469.

**Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanon M, et al.** (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410: 50-56

**Nagasawa T, Kikutani T, Kishimoto T** (1994). Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proceedings National Academy Of Sciences USA* 91: 2305-2309

**Nakamura H, Izumoto Y, Kambe H, Kuroda T, Mori T, Kawamura K, Yamamoto H, and Kishimoto T** (1994). Molecular Cloning of Complementary DNA for a Novel Human Hepatoma-Derived Growth Factor. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 25143-25149.

**Okuda Y, Nakamura H, Yoshida K, Enomoto H, Uyama H, Hirotani T, Funamoto M, Ito H, Everett A, Hada T, and Kawase I** (2003). Hepatoma-derived growth factor induces tumorigenesis in vivo through both direct angiogenic activity and induction of vascular endothelial growth factor. *Cancer Science* 94: 1034-1041.

**Oliver J, and Al-Awqati Q** (1998). An Endothelial Growth Factor Involved in Rat Renal Development. *The Journal of Clinical Investigation* 102: 1208-1219.

**Park M, Park J, Jeon C, Lee K, Chang H** (2002). *Journal of Korean Medical Sciences* 17: 497-501.

**Phillips R, Burdick M, Lutz M, Belperio J, Keane M, Strieter R** (2003). The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167: 1676-1686

**Ren H, Tang X, Lee J, Feng L, Everett A, Hong W, Khuri F, and Mao L** (2004). Expression of Hepatoma-Derived Growth Factor is a Strong Prognostic Predictor for Patients With Early-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 22 (16): 3230-3237.

**Sledz C, Holko M, de Veer M, Silverman R, and Williams B** (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nature Cell Biology* 5: 834-839

**Srivastava S, Kumar K, and Kaufman R** (1998). Phosphorylation of eukaryotic translation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 273: 2416-2423

**Thompson J** (1995). Molecular cloning and expression of carcinoembryonic antigen family members. *Tumour Biology* 16: 10-16

**Vila-Coro A, Rodriguez-Frade J, Martin De Ana A, Moreno-Ortiz M, Martinez-A C, Mellado M** (1999). The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *Federal American Society for Experimental Biology* 13: 1699-1710

**Vlahakis S, Villasis-Keever A, Gomez T, Vanegas M, Vlahakis N, Paya C** (2002). G protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathways. *The Journal of Immunology* 169: 55446-5554

**Vogelstein B, Fearon E, Hamilton S, Kern S, Preisinger A, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits A, and Bos J** (1988). Genetic alterations during

colorectal-tumor development. The New England Journal of Medicine 319 (9): 525-532.

**Yoshida K, Nakamura H, Okuda Y, Enomoto H, Kishima Y, Uyama H, Ito H, Hirasawa T, Inagaki S, and Kawase I** (2003). Expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocarcinogenesis. Journal of Gastroenterology and Hepatology 18: 1293-1301.

**Yoshitake N, Fukui H, Sekikawa A, Fujii S, Tomita S, Ichikawa K, Imura J, Hiraishi H, Fujimori T** (2008). Expression of SDF-1 $\alpha$  and nuclear CXCR4 predicts lymph node metastasis in colorectal cancer. British Journal of Cancer 98: 1682-1689

**Zhang J, Ren H, Yuan P, Lang W, Zhang L, and Mao L** (2006). Down-regulation of Hepatoma-Derived Growth Factor Inhibits Anchorage-Independent Growth and Invasion of Non-Small Cell Lung Cancer Cells. Cancer Research 66: 18-23

**Zhou M, Peng J, Zhang H, Wang H, Zhong Z, Pan X, Chen W, Leng X** (2005). Identification of two naturally presented MAGE antigenic peptides from a patient with hepatocellular carcinoma by mass spectrometry. Immunology letters 15;99(1):113-21

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFP	Alpha-Fetoprotein
Akt	Proteinkinase B
APC	„Adenomatous Polyposis Coli gene“
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
cDNA	„copy“ Desoxyribonukleinsäure
CEACAM	„Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule“
CXCR4	„Chemokine [C-X-C motif] Receptor 4“
DCC	„Deleted in Colorectal Cancer gene“
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
dest. H <sub>2</sub> O	destilliertes H <sub>2</sub> O
DIABLO	„direct IAP binding protein with low pI“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	„Epidermal Growth Factor“
Erk	„Extracellular signal-regulated kinase“
et al.	und andere („et alii“)
FBS	Fötale Bovines Serum
ff	vorwärts („forward“)
FLS-Mäuse	„Fatty Liver Shionogi Mice“
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

## Anhang

GFP	„Green Fluorescence Protein“
HATH	„Homologous at the Amino Terminus of HDGF“
HDGF	„Hepatoma Derived Growth Factor“
HEPES	N- [2-Hydroxyethyl] piperazine-N´ - [2,ethansäure]
HMG	„High Mobility Group“
HT29	humane Kolonkarzinomzelllinie
HuH-7	„Human Hepatoma Cell Line 7“
IAP	„Inhibitor of Apoptosis Protein“
IFI16	„Interferon, gamma-inducible protein 16“
IFI44L	„Interferon-Induced Protein 44-like“
IFITM1	„Interferon Induced Transmembrane Protein 1“
IFN	Interferon
IPF	idiopathische pulmonale Fibrose
IRF9	„Interferon Regulatory factor 9“
ISG	„Interferon-Stimulated Genes“
Jak	Januskinase
KBE	„Kolonie bildende Einheit“
kbp/kb	Kilobasenpaar
K-RAS	„Kirsten Rat Sarcoma 2 viral oncogene homolog“
LB-Medium	„Lysogeny Broth“-Medium
MAGE-A12	„Melanoma Antigen Family A12“
MAGE-A3	„Melanoma Antigen Family A3“
MEM	„Modified Eagle Medium“
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	„Non-Essential Amino Acids“
NLS	nukleäre Lokalisierungssequenz
NSCLC	Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom

## Anhang

NTC	Non Template Control
OD	Optische Dichte
PBS	„Phosphat Buffered Saline“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	„Platelet Derived Growth Factor“
Pen	Penicillin
pI	isoelektrischer Punkt
RISC	„RNA-Induced Silencing Complex“
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rpm	„rotations per minute“
RSAD2	„Radical S-Adenosyl methionine Domain containing 2“
RT	Reverse Transkriptase
rw	rückwärts („reward“)
SAPK/JNK	„Stress-Activated Phospho-Kinases“
SDF-1 $\alpha$	„Stromal cell-Derived Factor 1 $\alpha$ “
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	„small interfering RNA“
Smac	„Second mitochondria activator of caspases“
ssRNA	einzelsträngige RNA
Stat	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription
Strep	Streptomycin
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	„Tris Buffered Saline“
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur („temperature of melting“)
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor, Lymphknoten („nodes“), Metastasen

## Anhang

---

TRIM22	„Tripartite Motif-containing 22“
Tris	Trishydroxymethan
Tyk2	Tyrosinkinase 2
U	„Unit“ (Enzymeinheit)
UBE2L6	„Ubiquitin-conjugating Enzyme E2L 6“
UICC	„Union Internationale Contre le Cancer“
VEGF	„Vascular Endothelial Growth Factor“
XAF1	„XIAP Associated Factor-1“

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Genetisches Tumorprogressionsmodell.....	4
Abb. 2: Mechanismus der RNA Interferenz .....	11
Abb. 3: Konstruktionsschema siRNA (Manual von Ambion).....	19
Abb. 4: Plasmidvektor pSilencer 3.1-H1 puro (Manual von Ambion).....	20
Abb. 5: Kolonie-PCR hdgf-siRNA II .....	39
Abb. 6: Kolonie-PCR hdgf-siRNA IV.....	40
Abb. 7: Maxipräparation hdgf-siRNA II & hdgf-siRNA IV .....	41
Abb. 8: Sequenzierung hdgf-siRNA II.....	41
Abb. 9: Sequenzierung hdgf-siRNA IV .....	42
Abb. 10: HDGF-Inaktivierung durch hdgf-siRNA II (transiente Transfektion) ...	43
Abb. 11: HDGF-Inaktivierung durch hdgf-siRNA IV (transiente Transfektion) ..	43
Abb. 12: HDGF-Inaktivierung durch hdgf-siRNA II (stabile Transfektion) .....	44
Abb. 13: HDGF-Inaktivierung durch hdgf-siRNA IV (stabile Transfektion) .....	45
Abb. 14: Die Jak-Stat-Signalkaskade (Max-Planck-Institut) .....	54

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms.....	2
Tab. 2: Geräte .....	15
Tab. 3: Chemikalien .....	16
Tab. 4: Enzyme und Puffer.....	16
Tab. 5: Fertigsätze .....	17
Tab. 6: Standardlösungen .....	17
Tab. 7: Bakterien .....	17
Tab. 8: Medien für Bakterien .....	18
Tab. 9: Eukaryontische Zelllinie.....	18
Tab. 10: siRNA-Inserts .....	19
Tab. 11: Primer für PCR und Sequenzierung.....	21
Tab. 12: Sonde und Primer für Realtime-PCR .....	21
Tab. 13: Reaktionsansatz Hybridisierung .....	22
Tab. 14: Reaktionsansatz Ligation .....	22
Tab. 15: Reaktionsansatz Kolonie-PCR, PCR-Parameter.....	24
Tab. 16: Reaktionsansatz Doppelverdau .....	25
Tab. 17: Agarosegelelektrophorese .....	26
Tab. 18: Reaktionsansatz Exosap-Verdau, PCR-Parameter.....	28
Tab. 19: Reaktionsansatz Sequenzier-Reaktion, PCR-Parameter.....	28
Tab. 20: Reaktionsansatz Ethanol-Fällung.....	29
Tab. 21: Reaktionsansatz cDNA-Synthese, PCR-Parameter .....	32
Tab. 22: Reaktionsansatz HDGF Realtime-PCR.....	33
Tab. 23: Reaktionsansatz GAPDH Realtime-PCR .....	33
Tab. 24: Transformationseffizienz siRNA II .....	38
Tab. 25: Transformationseffizienz siRNA IV.....	38
Tab. 26: Genexpressionsanalyse hdgf-siRNA II; inaktivierte Gene .....	47
Tab. 27: Genexpressionsanalyse hdgf-siRNA IV; inaktivierte Gene.....	48
Tab. 28: Genexpressionsanalyse hdgf-siRNA IV: hochregulierte Gene .....	48

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

---

Name Anika Grell, geb. Ledwoch  
Geburtsdatum/-ort 10.03.1981 in Hannover  
Adresse Lindenstr. 25, 71634 Ludwigsburg  
Email  
Familienstand verheiratet

## Schulbildung

---

*Schillerschule Hannover*  
08/93 - 06/01 Besuch des Gymnasiums  
06/01 Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife  
01/98 - 12/98 High School Aufenthalt in Hamilton, Neuseeland

## Studium

---

*Fachhochschule Konstanz*  
08/01 - 12/02 Studium der Angewandten Weltwirtschaftssprachen  
07/02 Vordiplom in Wirtschaftssinologie  
*Julius-Maximilians-Universität Würzburg*  
04/03 - 06/09 Studium der Humanmedizin, Abschluß: Staatsexamen  
10/03 - 10/05 Studienelement „Chinesisch für Wirtschaftswissenschaftler“

## Praktisches Jahr

---

*Neurologische Klinik des Universitätsklinikums Würzburg*  
02/08 - 06/08 Neurologie (Allgemeine Neurologie, Multiple Sklerose)  
*Medizinische Universitätsklinik Würzburg*  
06/08 - 10/08 Innere Medizin (Endokrinologie, Kardiologie)  
*Spitalzentrum Biel/Bienne, Schweiz*  
10/08 - 01/09 Chirurgie (Allgemeine Chirurgie, Notfallstation)02/08 - 06/08

## Tätigkeit

---

*Neurologische Klinik des Klinikums Ludwigsburg*  
Seit 09/09 Assistenzärztin der Neurologie

Ludwigsburg, Februar 2010

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Scheppach sowie Herrn Priv.-Doz. Dr. Ralph Melcher danke ich für die Möglichkeit, die hier vorgestellte Arbeit im gastroenterologischen Labor an der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg durchzuführen.

Ich danke Herrn Dr. Theodor Kudlich für die Überlassung des Themas und die sorgfältige Planung und Vorbereitung der Arbeit.

Insbesondere danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. Ralph Melcher. Ich danke für die Planung und Vorbereitung der Arbeit, für die Einarbeitung im Labor, die Einführung in die speziellen Methoden, die tatkräftige Unterstützung, die wertvollen Anregungen, die stetige Motivation sowie für die exzellente und sehr zuverlässige Betreuung während der gesamten Promotionsarbeit.

Den Mitarbeiterinnen des gastroenterologischen Labors unter Leitung von Frau Gerda Dusel gebührt ebenfalls ein sehr großer Dank für die freundliche und stete Unterstützung während meiner gesamten Promotionsarbeit.

Ich danke Frau Kerstin Backhaus für die Einarbeitung und Unterstützung bei der Sequenzierung sowie für ihre Hilfe in der Zellkultur. Auch Frau Donata Dorbath möchte ich für ihre tatkräftige Unterstützung in der Zellkultur danken. Frau Elisabeth Kelber gilt mein Dank für ihre wertvollen Anregungen im Rahmen der Zellkultur sowie für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Zellkultur und der Zytotoxizitätstests. Ich danke Frau Antje Volk für die Einarbeitung in die Realtime-PCR und die Unterstützung während der Durchführung dieser Methode.

Ein großer Dank gilt auch Frau Dr. Dorothee Rogoll, die mich unter anderem in die Auswertung der Realtime-PCR eingeführt und mir viele Anregungen gegeben hat.

Frau Dr. Elena Hartmann aus der AG Rosenwald des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg gilt mein Dank für die Durchführung und Hilfe bei der Auswertung der cDNA-arrays.