

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Urologische Klinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

Direktor: Univ.-Prof. Dr. J.E. Gschwend

EMMPRIN (CD 147): Ein Schlüsselprotein in der Tumorprogression des Harnblasenkarzinoms

Andreas Robert Kurzrock

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E.J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J.E. Gschwend
2. apl. Prof. Dr. M. Retz
3. Univ.-Prof. Dr. G. Multhoff

Die Dissertation wurde am 29.11.2012 bei der Technischen
Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 17.07.2013 angenommen.

„καὶ ἀποκριθεὶς ὁ Ἰησοῦς εἶπεν πρὸς αὐτούς,
Οὐ χρείαν ἔχουσιν οἱ ὑγιαίνοντες ἰατροῦ ἀλλὰ οἱ κακῶς ἔχοντες.“

„Und Jesus sprach in seiner Antwort zu ihnen:
Nicht die Gesunden haben den Arzt notwendig, sondern die Kranken.“

Lk 5, 31

gewidmet meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis..... | 5 |
| 1 Einleitung..... | 9 |
| 1.1 Das humane Harnblasenkarzinom | 9 |
| 1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren | 9 |
| 1.1.2 TNM-Staging und Grading WHO 2004 | 9 |
| 1.1.3 Histopathologie und Molekulargenetik | 12 |
| 1.1.4 Aktuelle Therapieoptionen..... | 13 |
| 1.2 EMMPRIN / CD147 – Ein multifunktionelles Glykoprotein | 13 |
| 1.2.1 Struktur und (sub)zelluläre Lokalisation..... | 14 |
| 1.2.2 Funktionelle Eigenschaften und assoziierte Proteine | 15 |
| 1.2.2.1 Multifunktionalität von EMMPRIN..... | 16 |
| 1.2.2.2 Glykosyliertes EMMPRIN als Induktor für MMPs und für die Angiogenese | 17 |
| 1.2.3 EMMPRIN als Target-Molekül für Therapien | 19 |
| 1.2.4 EMMPRIN im humanen Harnblasenkarzinom | 20 |
| 1.3 Fragestellung..... | 22 |
| 2 Material und Methoden..... | 23 |
| 2.1 Material..... | 23 |
| 2.1.1 Chemikalien | 23 |
| 2.1.2 verwendete Puffer, Lösungen und Medien..... | 23 |
| 2.1.3 Antikörper..... | 23 |
| 2.1.4 Plasmide & Vektoren | 24 |
| 2.1.5 siRNA-Oligonukleotide..... | 24 |
| 2.1.6 Geräte | 25 |
| 2.1.7 Verbrauchsmaterialien | 27 |
| 2.2 Zellkulturmethoden | 27 |
| 2.2.1 Herkunft der Zelllinien | 27 |
| 2.2.2 Kulturmedien | 29 |
| 2.2.3 Kulturbedingungen | 30 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.2.4 | Zellzählung und Vitalitätstest mit Trypanblau..... | 31 |
| 2.2.5 | Auftauen und Einfrieren eukaryotischer Zellen | 32 |
| 2.3 | Molekularbiologische Methoden | 33 |
| 2.3.1 | Klonierung | 33 |
| 2.3.1.1 | Klonierung von shDNA in Plasmide | 33 |
| 2.3.1.2 | Verwendete Vektoren..... | 35 |
| 2.3.2 | Vermehrung und Isolierung von Plasmid-DNA in chemisch kompetenten Bakterien..... | 36 |
| 2.3.2.1 | Kultur und Vermehrung von E.coli..... | 36 |
| 2.3.2.2 | Transformation von Plasmid-DNA in E. coli | 37 |
| 2.3.2.3 | Anlegen von Glycerolstocks | 37 |
| 2.3.2.4 | Plasmid-Präparation..... | 37 |
| 2.3.3 | Bestimmung des DNA-Gehalts und DNA-Restriktionsverdau..... | 38 |
| 2.3.4 | Analyse von DNA in der Agarosegelelektrophorese | 39 |
| 2.3.5 | Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen | 40 |
| 2.3.6 | Synthese der Erststrang-c-DNA | 40 |
| 2.3.7 | DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR)..... | 41 |
| 2.4 | siRNA-Technologie..... | 42 |
| 2.4.1 | Einführung..... | 42 |
| 2.4.2 | Transiente Transfektion eukaryoter Zellen mit siRNA-Oligonukleotiden..... | 43 |
| 2.4.3 | Stabile Transduktion mit shRNA mittels Infektion der Zellen mit Lentivirus..... | 44 |
| 2.4.4 | Stabile Transfektion mit siRNA und ON/OFF-Modulation der Plasmide durch das pTETON-System | 45 |
| 2.4.4.1 | Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA..... | 47 |
| 2.4.4.2 | Picken der Einzelklone & Luciferase-Tests | 48 |
| 2.4.4.3 | Aktivierung des pTETON-Systems durch Stimulation mit Doxycyclin | 49 |
| 2.5 | Funktionelle Assays | 50 |
| 2.5.1 | Herstellung stabiler Zelllinien | 50 |
| 2.5.2 | Migration der Zellen im Scratch-Assay | 50 |
| 2.5.3 | Proliferation-Assays | 51 |
| 2.5.3.1 | XTT-Assay | 51 |
| 2.5.3.2 | BrdU-Inkorporation..... | 52 |
| 2.5.4 | FACS-Analyse | 53 |
| 2.5.5 | Apoptose-Assay (Messung der Aktivität von Caspase 3 / 7) | 55 |

| | |
|---|-----------|
| 2.6 Proteinbiochemische Methoden | 56 |
| 2.6.1 Herstellung von Zelllysaten | 56 |
| 2.6.2 Proteinbestimmung im BCA-Test | 57 |
| 2.6.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese..... | 58 |
| 2.6.4 Westernblot..... | 59 |
| 2.6.5 Detektion der Proteine im Immunoblot..... | 60 |
| 2.6.6 Entfernung von Antikörpern von Membranen | 62 |
| 2.7 Bildanalyse und Quantifizierung von Banden im Immunoblot.. | 62 |
| 2.8 Statistische Auswertungen | 62 |
| 3 Ergebnisse | 63 |
| 3.1 Nachweis der EMMPRIN-Expression in humanen Harnblasenkarzinomzelllinien auf mRNA- und Protein-Ebene | 63 |
| 3.2 EMMPRIN-Expression im Harnblasenkarzinom-Gewebe | 64 |
| 3.3 EMMPRIN-Expression im TMA Harnblasenkarzinom | 65 |
| 3.4 Etablierung von Modellen für die Modifikation der EMMPRIN-Expression | 66 |
| 3.4.1 Transientes EMMPRIN-Silencing mit si-RNA-Oligonukleotiden und maximales Silencing an den Tagen d3-d5..... | 66 |
| 3.4.2 Stabiles EMMPRIN-Silencing nach Lentivirus vermittelter Transduktion der Harnblasenkarzinomzellen mit shRNA | 70 |
| 3.4.2.1 Testung der Infektionseffizienz mittels GFP | 70 |
| 3.4.2.2 Inhibition der EMMPRIN-Protein-Expression | 72 |
| 3.4.3 Stabiles EMMPRIN-Silencing mittels des konditionalen TetON-Expressionssystems | 73 |
| 3.4.3.1 Etablierung eines pTETON/pTRE2 HygLuc positiven Zellklons | 74 |
| 3.4.3.2 Klonierung von spezifisch gegen EMMPRIN gerichteten shRNA-Oligonukleotiden in das Plasmid pENTR | 75 |
| 3.4.3.3 Stabile Inhibition der EMMPRIN-Expression | 76 |
| 3.5 Funktionelle Veränderungen in den Harnblasenkarzinomzellen in vitro in Abhängigkeit der EMMPRIN-Expression | 77 |
| 3.5.1 Verändertes Zellwachstum bei pTETON-vermitteltem EMMPRIN-Silencing | 77 |
| 3.5.2 Einfluss des EMMPRIN-Silencing auf Zellmetabolismus, Apoptose und Proliferation | 79 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.5.2.1 | EMMPRIN-abhängiger Zellmetabolismus im XTT-Test..... | 79 |
| 3.5.2.2 | Apoptose der Zellen im Caspase-Assay | 80 |
| 3.5.2.3 | Einfluss von EMMPRIN auf Zell-Proliferation | 82 |
| 3.5.3 | Einfluss des EMMPRIN-Silencing auf das Migrationsverhalten der Zellen im Scratch-Assay | 86 |
| 4 | Diskussion..... | 92 |
| 4.1 | Expression von EMMPRIN in Harnblasenkarzinomzelllinien | 92 |
| 4.2 | Prognostische Bedeutung der EMMPRIN-Expression im humanen Harnblasenkarzinom..... | 93 |
| 4.3 | EMMPRIN-Knockdown in Harnblasenkarzinomzelllinien mittels siRNA..... | 94 |
| 4.3.1 | Transientes Silencing mit spezifischen siRNA-Oligonukleotiden ... | 94 |
| 4.3.2 | Stabiles Silencing mittels Lentivirus | 95 |
| 4.3.3 | Konditionales Silencing im pTETon-System | 95 |
| 4.4 | Funktionelle Untersuchungen an Harnblasenkarzinomzellen in-vitro in Abhängigkeit der EMMPRIN-Expression | 96 |
| 4.4.1 | Korrelation zwischen EMMPRIN-Expression und Proliferation | 96 |
| 4.4.2 | Metabolismus..... | 98 |
| 4.4.3 | EMMPRIN beeinflusst Caspasen-Aktivität und Apoptose..... | 99 |
| 4.4.4 | Bedeutung von EMMPRIN für die Migration | 99 |
| 4.5 | EMMPRIN als mögliches Targetmolekül für zukünftige Therapie-Strategien beim Harnblasenkarzinom | 101 |
| 5 | Zusammenfassung und Ausblick..... | 104 |
| 6 | Anhang..... | 107 |
| 6.1 | Literaturverzeichnis | 107 |
| 6.2 | Buchbeiträge und Monographien..... | 116 |
| 6.3 | Internetquellen..... | 117 |
| 6.4 | Abbildungsverzeichnis | 118 |
| 6.5 | Diagrammverzeichnis | 119 |
| 6.6 | Tabellenverzeichnis | 120 |
| 6.7 | Plasmidkarten..... | 121 |
| | Danksagung | 123 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|---|
| °C | Grad Celsius (Temperatur) |
| 3D | Dreidimensional |
| 7-AAD | 7-Aminoactinomycin D |
| Abb. | Abbildung |
| A.d. | Aqua dest. (destilliertes Wasser) |
| Akt | serine-threonine kinase |
| APC | Allophycocyanin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäuren |
| BCA | bicin chonic acid (Proteintest nach Bradford) |
| BCG | Bacillus Calmette-Guérin |
| bp | Basenpaare |
| BrdU | Bromdesoxyuridin |
| bzw. | beziehungsweise |
| CIS | carcinoma in situ |
| CyP | Cyclophilin |
| ctrl. | Kontrolle |
| d | Tag |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | enhanced chemiluminescence |
| E. coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGF | epithelial growth factor |
| ELISA | enzyme linked immunosorbent assay / enzymgekoppelter Immunadsorptionstest |
| EMMPRIN | extracellular matrix metalloproteinase inducer |
| ERK | extracellular signal-related kinase |
| evtl. | eventuell |
| FACS | fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie) |
| FAK | focal adhesion kinase |
| FBS=FCS | fetal bovine serum (fötales Rinderserum) |

| | |
|------------------|---|
| FGFR3 | Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3 |
| g | Erdbeschleunigung bzw. Gramm |
| G | Grading (Differenzierungsstufen von Tumoren) |
| h | Stunde |
| H ₂ O | Wasser |
| HG-EMMPRIN | high-glycosylated EMMPRIN |
| HRP | horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase) |
| HSV | Herpes simplex Virus |
| Ig | Immunglobulin |
| IRES | internal ribosomal entry site |
| kb | kilo-Basen |
| kDa | kilo-Dalton |
| l | Liter |
| LG-EMMPRIN | low-glycosylated EMMPRIN |
| M | Status der Fernmetastasen |
| min | Minuten |
| MCT | Monocarboxylat-Transporter |
| MCS | Multiple Cloning Site |
| MEK | Map-Erk Kinase |
| MMP | Matrixmetalloproteinase |
| mTCC | muscle invasive transitional cell carcinoma |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid |
| N | node (Status der regionalen Lymphknoten) |
| NEA | nicht essentielle Aminosäuren |
| nt | Nukleotid |
| mol | Mol |
| OD | Optische Dichte = Extinktion |
| p | Plasmid |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung |
| PCR | polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion) |
| PenStrep | Penicillin Streptomycin |
| PL | Petrophaga lorioti |
| PMSF | Phenylmethylsulfonyl Fluorid |
| PMS | Phenazin Methosulfat |

| | |
|--------------------|---|
| PUNLMP | nichtinvasive papilläre urotheliale Neoplasie niedrig maligner Potenz |
| PVDF-Membran | Polyvinyliden Fluorid-Transfermembran |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAi | RNA-interference |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | reverse transkriptase-PCR |
| rtTA | Tet-responsiver transkriptioneller Aktivator |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| sec | Sekunde |
| shRNA | short <i>oder</i> short hairpin RNA |
| siRNA | small interfering RNA |
| sog. | sogenannt(e) |
| sTCC | superficial transitional cell carcinoma |
| stim. | durch Doxyzyklingabe stimuliert, d.h. der pTETON-Vektor ist aktiv |
| T | Tumorgröße (Stadium) |
| Tab. | Tabelle |
| TBS | trisbuffered saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung) |
| TBST | TBS mit Tween (Polysorbat 20) |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TCC | transitional cell carcinoma |
| TCSF | tumor collagenase stimulatory factor |
| TE-Puffer | Tris-EDTA Puffer |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TetR | Tet-Repressor |
| TMA | tissue microarray |
| TNM-Klassifikation | Tumor-Node-Metastases-Klassifikation |
| TRE | Tet responsives Element |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| tTA | Tet-responsiver transkriptioneller Aktivator |
| TUR-B | Transurethrale Resektion eines Blasen Tumors |
| U | Unit; Einheit der Enzymaktivität |
| UICC | Union International Contre le Cancer |

| | |
|------|---|
| UV | Ultraviolettes Licht |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| v/v | volume per volume |
| w/v | weight per volume |
| XTT | 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)- 2H-tetrazoliumhydroxid |

1 Einleitung

1.1 Das humane Harnblasenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie¹ und Risikofaktoren

Jedes Jahr werden in Deutschland ca. 28.000 Neuerkrankungen am Harnblasenkarzinom registriert. Als ein Karzinom besonders des alten Menschen sind Männer mit einem mittleren Erkrankungsalter von 71 Jahren etwa dreimal häufiger betroffen als Frauen, welche durchschnittlich erst mit 74 Jahren erkranken. Aufgrund der Zusammenfassung von vollständig-invasiven und oberflächlichen insitu-Karzinomen der Harnblase mit Neubildungen unsicheren und unbekanntem Verhaltens steht beim Mann die Harnblase mit knapp 10 % an vierter Stelle aller Tumorlokalisationen nach Prostata-, Darm- und Lungenkrebs. In 95 % der Fälle handelt es sich bei diesen malignen Neubildungen um Urothelkarzinome, die auch als Transitionalzell- oder Übergangsepithelkarzinome bezeichnet werden. Sehr viel seltener sind Plattenepithel- oder Adenokarzinome der Harnblase. Die erstgenannten Urothelkarzinome entstehen unter dem Einfluss von Kanzerogenen, die im Harn aktiviert werden und durch die Reservoirfunktion der Blase besonders lange auf das Urothel einwirken.

Als Risikofaktoren gelten mit Latenzzeiten von durchschnittlich 24 Jahren² zwischen Exposition und Auftreten des Karzinoms u.a. polyzyklische Kohlenwasserstoffe im Tabakrauch und die Exposition gegenüber aromatischen Aminen in der Farbenchemie z.B. bei Friseuren³. Für die Karzinogenese wird ein multifaktorielles Geschehen mit exogenen und endogenen Noxen angenommen. Noch weitgehend unklar sind genetische Zusammenhänge.

1.1.2 TNM-Staging und Grading WHO 2004

Eine Einteilung der Tumorstadien der Urothelkarzinome erfolgt derzeit wie in anderen Tumorentitäten durch die sog. „Tumor-Node-Metastases-Klassifikation“ (TNM-Klassifikation). In der folgenden Tabelle 1 ist die TNM-Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms gemäß der Union International Contre le Cancer (UICC) von 2002⁴ wiedergegeben:

¹ Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. 6. Überarbeitete Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin 2008.

² Rübber H, Otto T: Harnblasenkarzinom. 3. Auflage. Berlin, Heidelberg, Springer, 2001: 85-158.

³ Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. 6. Überarbeitete Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin 2008.

⁴ Manual Urogenitale Tumoren, Treiber et al., Tumorzentrum München (Hrsg), 4. Auflage München 2008.

| | | | |
|-----------|--|------------|---|
| TX | Primärtumor kann nicht beurteilt werden | | |
| T0 | kein Anhalt für Primärtumor | Ta | nicht-invasives papilläres Karzinom |
| | | Tis | Carcinoma in situ |
| T1 | Tumor infiltriert subepitheliales Gewebe | | |
| T2 | Tumor infiltriert Muskulatur | T2a | Infiltration der inneren Muskulatur |
| | | T2b | Infiltration der äußeren Muskulatur |
| T3 | Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe | T3a | mikroskopische Infiltration |
| | | T3b | Makroskopische Infiltration |
| T4 | Infiltration umgebender Organe | T4a | Infiltration von Prostata oder Uterus oder Vagina |
| | | T4b | Infiltration der Bauch- und/oder Beckenwand |

| | |
|-----------|---|
| NX | regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden |
| N0 | keine regionären Lymphknotenmetastasen |
| N1 | Metastase in solitärem Lymphknoten ≤ 2 cm |
| N2 | Metastase in solitärem Lymphknoten > 2 aber ≤ 5 cm oder in multiplen Lymphknoten ≤ 5 cm |
| N3 | Metastase in Lymphknoten ≥ 5 cm |

| | |
|-----------|--|
| MX | Fernmetastasen können nicht beurteilt werden |
| M0 | keine Fernmetastasen |
| M1 | Fernmetastasen |

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms nach UICC 2002: T steht für Ausdehnung des Primärtumors, N für das Fehlen oder Vorhandensein von (juxta-)regionären Lymphknotenmetastasen und M für die Ausprägung der Metastasierung.

Die TNM-Klassifikation wurde zuletzt 2002 hinsichtlich des T2-Stadiums geändert, wobei jetzt die Infiltrationstiefe des Tumors in die Blasenwand berücksichtigt wird. Nachfolgende Abbildung 1 verdeutlicht die TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms in Abhängigkeit von der Invasionstiefe:

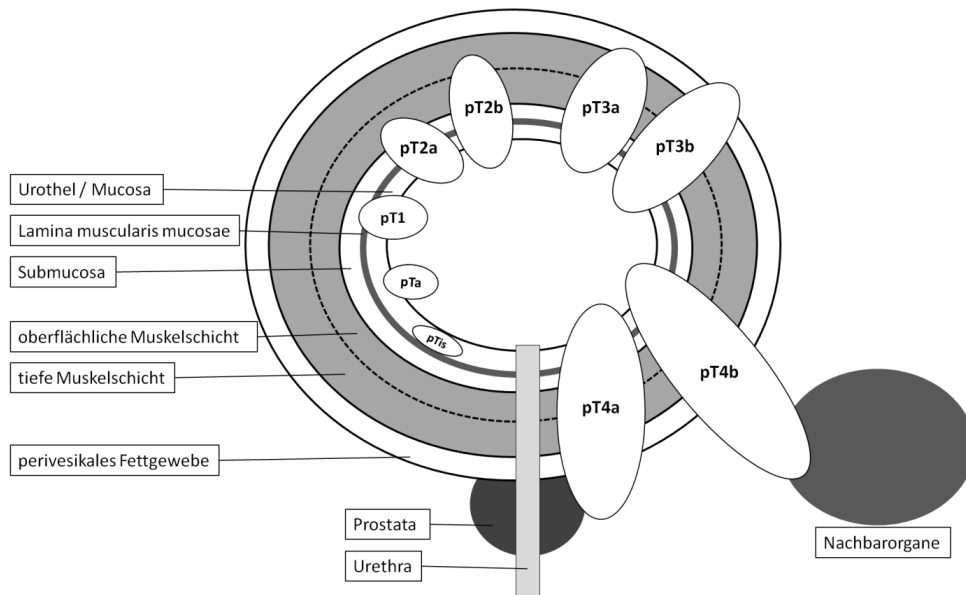


Abbildung 1: Tumoreindringtiefe des Harnblasenkarzinoms.

Gemäß der WHO-Klassifikation von 2004⁵ werden Urothelkarzinome in nicht-invasive und invasive Karzinome unterteilt in Abhängigkeit der Infiltration in die Lamina propria, einer gefäßreichen Bindegewebsschicht unterhalb des Urothels. Eine Übersicht gibt Tabelle 2:

| | | |
|----------------------------------|---|---|
| normal | normales Urothel, inklusive früherer Diagnose „milde Dysplasie“ | |
| nicht-invasive Neoplasien | Hyperplasie | flache Hyperplasie |
| | | papilläre Hyperplasie |
| | flache Läsionen mit Atypien | reaktive (entzündliche) Atypie |
| | | Atypie mit unklarer Bedeutung |
| | | urotheliale Dysplasie |
| | | Carcinoma in situ (Cis) |
| | papilläre Läsionen | urotheliales Papillom |
| | | invertiertes Papillom |
| | | papilläre urotheliale Neoplasie niedrig-malignen Potentials (PUNLMP) |
| | | papilläres urotheliales Karzinom, low grade |
| | | papilläres urotheliales Karzinom, high grade |

⁵ Eble JE et al.: Tumors of the urinary system and male genital organs. WHO classification of tumors. IA-RC Press Lyon 2004.

| | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|--|
| <i>invasive Neoplasien</i> | Invasion der Lamina propria | |
| | Invasion der Muscularis propria | |

Tabelle 2: WHO-Klassifikation von Tumoren 2004.

1.1.3 Histopathologie und Molekulargenetik

Die bisherige Einteilung der Tumorzeldifferenzierung in die Grade G1-G3 wurde durch ein neues Grading ersetzt. Low-grade-Tumoren zeigen histopathologisch ein geordnetes Erscheinungsbild und eine geringe Proliferation. Die hierfür maßgebende Cytokeratin-20-Expression (CK-20) lässt sich ausschließlich in den oberflächlichen Deckzellen des Urothels nachweisen, wohingegen High-grade-Tumoren in allen urothelialen Zellen CK-20 exprimieren und ein entdifferenziertes Wachstum und ungeordnete Proliferation zeigen (Stoehr und Hartmann, 2007). Die dritte Gruppierung mit der Bezeichnung PUNLMP (nichtinvasive papilläre urotheliale Neoplasie niedrig maligner Potenz) zeigt keine Invasivität oder Metastasierung, sondern lediglich minimale Veränderungen der Histoarchitektur in einem verdickten Urothel. Das Carcinoma in situ (Cis) ist obligate Vorstufe des invasiven Urothelkarzinoms und entsteht seinerseits aus der urothelialen Dysplasie.

Bisherige Erkenntnisse über die molekulare Karzinogenese der Blasentumore basieren hauptsächlich auf Deletionen im Chromosom 9, p53-Alterationen oder Mutationen im Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-Gen (FGFR3-Gen). Dieser Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor ist eine klassische Rezeptor-Tyrosinkinase und scheint bisher „der erste reproduzierbare molekulare Marker für das Harnblasenkarzinom“ (Stoehr und Hartmann, 2007) zu sein, der eine Prognoseabschätzung nach histopathologischen Routineparametern verbessert. Eine neue Studie der Arbeitsgruppe Xue et al. hat 2010 gezeigt, dass auch EMMPRIN als Prognoseparameter beim Harnblasenkarzinom eingesetzt werden könnte, jedoch hierfür noch eine genauere Charakterisierung der Mechanismen und Funktionen von CD147 notwendig ist (Xue, Lu et al. 2010).

Eine Erforschung der grundlegenden Mechanismen der Karzinogenese und der Progression des Urothelkarzinoms erscheint sinnvoll, um in Zukunft ein besseres Verständnis der Erkrankung und eine individualisierte Therapie zu ermöglichen. Diesem Anliegen ist die vorliegende experimentelle Arbeit über die Funktionen von EMMPRIN in der Tumorprogression des humanen Harnblasenkarzinoms gewidmet.

1.1.4 Aktuelle Therapieoptionen

Aufgrund des sehr unterschiedlichen Krankheitsverlaufes des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms variieren die aktuellen Therapieoptionen von der transurethralen Resektion (TUR) mit möglicher adjuvanter, intravesikaler Instillationstherapie mit Chemotherapeutika oder Bacillus Calmette-Guérin (BCG) bis hin zur frühzeitigen radikalen Zystektomie mit konsekutiver Anlage von kontinenten oder inkontinenten Harnableitungen. Bei muskulinvasiven Harnblasenkarzinomen existieren mittlerweile neben der radikalen Zystektomie auch multimodale Therapiekonzepte kurativer Intention mit einer perkutanen Strahlentherapie oder einer simultanen Radiochemotherapie⁶. Aufgrund der nicht zu unterschätzenden Nebenwirkungen dieser teilweise beträchtlich invasiven therapeutischen Möglichkeiten scheint eine Erforschung einer neuen kurativen Therapieoption auf dem Boden der Grundlagenforschung sinnvoll, ja sogar notwendig. Ansatzpunkte könnte die Entwicklung von Antikörpern sein oder auch Inhibitoren von Molekülen, welche auf den malignen Zellstoffwechsel auf Protein-Ebene einwirken könnten.

1.2 EMMPRIN / CD147 – Ein multifunktionelles Glykoprotein

Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) ist ein multifunktionales Protein, das in verschiedenen funktionellen Kontexten gefunden worden ist, welche sich in der unterschiedlichen Namensgebung niederschlagen: Neben EMMPRIN / CD147 weisen Bezeichnungen wie Basigin, Neurothelin, OX-47, Hab18G, gp42, CE9, 5A11, M6, HT7 oder „tumor collagenase stimulatory factor“ (TCSF) auf die zahlreichen Funktionen dieses Moleküls hin. EMMPRIN / CD147 wurde schon in den 80iger Jahren des 20. Jahrhunderts als multifunktionelles Oberflächenmolekül auf diversen Tumorzellen erforscht (Biswas 1982). Es wird seit 1999 als CD147 in der Liste der Leukozytendifferenzierenden Antigene aufgeführt (Koch, Staffler et al. 1999).

Das für EMMPRIN codierende Gen befindet sich auf Chromosom 19p13.3 und besteht aus sieben Exons und sechs Introns mit einem Promoter 470 bp 5` upstream (-142 bis -112 bp) (Liang, Major et al. 2002).

EMMPRIN ist an der Regulation verschiedener zellulärer Vorgänge und Interaktionen zwischen den Zellen beteiligt und hat damit auch wichtige Funktionen in gesundem Gewebe (Biswas, Zhang et al. 1995; DeCastro, Zhang et al. 1996). Da EMMPRIN in einem Großteil aller bislang untersuchten Tumorentitäten exprimiert wird (Riethdorf,

⁶ Manual Urogenitale Tumoren, Treiber et al., Tumorzentrum München (Hrsg), 4. Auflage München 2008.

Reimers et al. 2006) und eine erhöhte EMMPRIN-Expression mit Metastasierung und Tumorprogression korreliert (Dean, Newman et al. 2009), wird EMMPRIN als wichtiger Faktor bei der Tumorprogression betrachtet.

Struktur, Funktion von EMMPRIN / CD147 und die mit dem EMMPRIN-Molekül funktionell assoziierte Proteine sind Inhalte der folgenden Kapitel.

1.2.1 Struktur und (sub)zelluläre Lokalisation

Strukturell ist EMMPRIN als Transmembranprotein der Familie der Immunglobuline (Ig) zuzuordnen (Gabison, Hoang-Xuan et al. 2005). Es wurden sowohl Homologien zu der variablen Region der Immunglobuline als auch zu der β -Kette des MHC-II Komplexes beschrieben (Miyachi, Kanekura et al. 1990; Seulberger, Lottspeich et al. 1990; Fossum, Mallett et al. 1991; Miyachi, Masuzawa et al. 1991). Ähnlich wie andere Moleküle der Ig-Superfamilie bildet EMMPRIN Oligomere in cis-Konfiguration aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der N-terminalen Ig-Domäne (Yoshida, Shibata et al. 2000).

Das Protein EMMPRIN besteht aus 269 Aminosäuren (AS) mit einer molekularen Masse von 27 kDa. Es existieren eine zytoplasmatische, eine Transmembran-Domäne und zwei extrazelluläre Domänen. Die 185 AS große extrazelluläre Domäne gliedert sich in zwei Immunglobulindomänen (Ig-Domäne) und verfügt über drei Polysaccharid-seitenketten (Tang, Chang et al. 2004), deren Glykosilierungszustand durch posttranslationale Modifikation das Molekulargewicht von 35-65 kDa bestimmt (Nawroth, Stohr et al. 2008) und die biologische Aktivität von EMMPRIN reguliert (Tang, Chang et al. 2004). An diesen extrazellulären Domänen finden zahlreiche molekulare Interaktionen statt. Die erste Ig-Domäne ist u.a. für die Induktion von Matrix-Metallo-Proteinasen zuständig und an der Oligomerisation beteiligt (Yurchenko, Zybarth et al. 2002). Eine zweite Ig-Domäne von EMMPRIN ist funktionell mit anderen Oberflächenproteinen assoziiert.

Eine Transmembrandomäne mit 24 AS und die 39 AS umfassende zytoplasmatische Domäne ermöglichen durch ihre strukturellen Besonderheiten Interaktionen mit weiteren EMMPRIN-Molekülen und auch mit anderen Proteinen. Dazu gehören z.B. Integrine und Cyclophiline, deren Interaktionen mit EMMPRIN in Kapitel 1.2.2.1 näher erläutert werden. Es werden Signale ins Innere der Zelle weitergeleitet und auch Interaktionen mit intrazellulären Proteinen eingegangen (Nabeshima, Iwasaki et al. 2006).

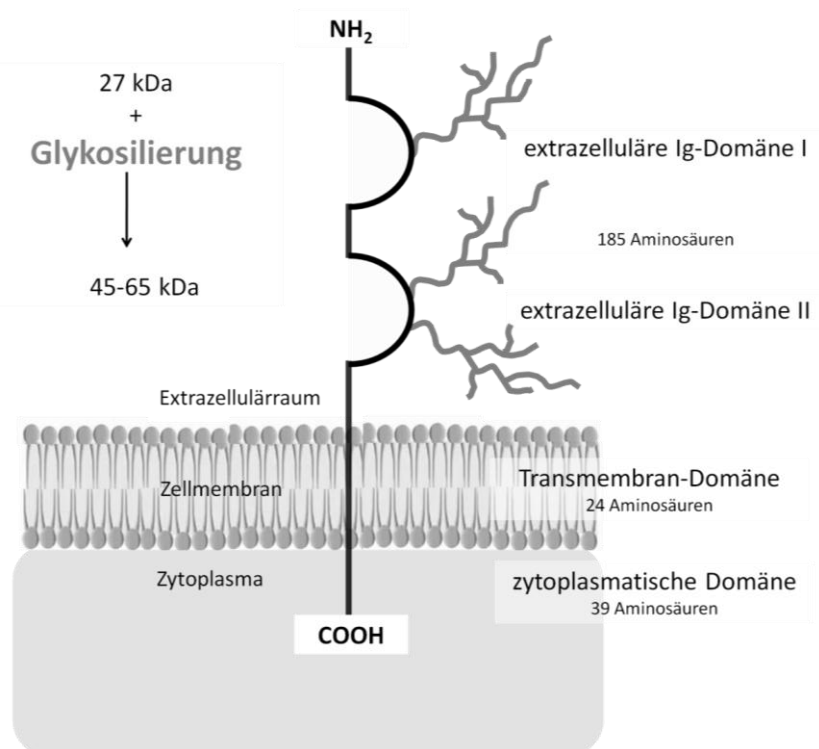


Abbildung 2: Schema der molekularen EMMPRIN-Struktur. Es ist schematisch ein EMMPRIN-Molekül in der Zellmembran dargestellt. Die verschiedenen Domänen und drei Oligosaccharid-Seitenketten sind abgebildet.

Interessant ist die Tatsache, dass hinsichtlich der Aminosäuresequenzen des EMMPRIN-Proteins vor allem die Transmembran-Domäne hochkonserviert ist und bei Spezies wie Mensch, Maus und Huhn zu 100% übereinstimmt (Yan, Zucker et al. 2005), wohingegen die extrazelluläre Region zwischen den Spezies sehr stark differiert. Und doch gibt es eine Übereinstimmung von 58 % der gesamten Aminosäuresequenz von EMMPRIN zwischen Mensch und Maus (Miyachi, Masuzawa et al. 1991).

1.2.2 Funktionelle Eigenschaften und assoziierte Proteine

In physiologischer Weise wirkt EMMPRIN bei der Kommunikation der Zellen untereinander mit und ist an der Zelldifferenzierung und -entwicklung und verschiedensten Funktionen des Immunsystems beteiligt. Dazu gehören z.B. die Spermatogenese oder die Lymphozytenaktivierung. EMMPRIN Knock-out Mäuse zeigten phänotypisch, dass die EMMPRIN-Expression entscheidend an Blastozysten-Implantation, Foetus-Entwicklung und männlicher Fertilität beteiligt ist (Igakura, Kadomatsu et al. 1998).

EMMPRIIN ist im Vergleich zu Normalgeweben auch auf der Oberfläche von diversen Tumorzellen stark exprimiert (Yan, Zucker et al. 2005) und spielt in seiner Expression eine Rolle bei Progression und Invasion dieser Tumoren (Zheng, Takahashi et al.

2006). Im Gegensatz dazu kann EMMPRIN in seiner Interaktion mit assoziierten Proteinen auch einen suppressiven Effekt auf Tumoren haben. Die zweite extrazelluläre Ig-Domäne von EMMPRIN ist mit Caveolin-1 assoziiert und im Komplex mit Caveolin-1 trägt EMMPRIN zum tumorsuppressiven Effekt bei (s. Abbildung 3) (Zucker, Hymowitz et al. 2001). Diese Eigenschaften werden im Zusammenwirken mit weiteren Proteinen deutlich. Dazu gehören Monocarboxylattransporter (MCT), Integrine, Matrixmetalloproteinasen (MMP) und Cyclophiline (CyP). Diese Multifunktionalität wird im Folgenden erläutert.

1.2.2.1 Multifunktionalität von EMMPRIN

Die multifunktionale Bedeutung von EMMPRIN während der Tumorprogression wird deutlich, wenn man die molekularen Interaktionspartner näher betrachtet:

Kirk et al. wiesen eine Interaktion mit den Monocarboxylat-Transportern MCT1 und MCT4 nach, welche im Rahmen des Zellmetabolismus für den Laktathaushalt essentiell sind (Kirk, Wilson et al. 2000). EMMPRIN hat Einfluss auf Lokalisation und Aktivität von verschiedenen in der Plasmamembran lokalisierten Monocarboxylat-Transportern (Iacono, Brown et al. 2007).

Integrine sind eine Gruppe von Membranproteinen, welche der Zelle eine Kommunikation mit ihrer Umgebung erlauben, indem externe Stimuli über Signalkaskaden internalisiert werden. EMMPRIN nimmt über die Interaktion mit Integrinen Einfluss auf Zell-Adhäsion, Angiogenese, Signaltransduktion, Chemotaxis und Proliferation (Weidle, Scheuer et al. 2010). Es wurde gezeigt, dass im humanen Leberzellkarzinom die Tumorinvasion und Metastasierung mit den Integrinen $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha 3\beta 1$ über den „fokal adhesion kinase“ FAK- und den PI3K-Signalweg im Zusammenhang stehen. Über monoklonale Antikörper gegen diese Integrine konnte der Effekt von EMMPRIN auf Adhäsion, Invasion und MMP-Induktion eingedämmt werden (Dai, Dou et al. 2009). Die EMMPRIN-Funktion scheint also von bestimmten Integrinen abhängig zu sein.

Cyclophiline (CyP) gehören zur Gruppe der Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen. Sie wirken als Faltungshelfer (Chaperone) in der spezifischen Proteinfaltung (Ausbildung der dreidimensionalen Struktur) (Galat 1993) und spielen eine wichtige Rolle in der Chemotaxis. In der Interaktion mit Cyclophilin A und B wirkt EMMPRIN offensichtlich als gemeinsamer Rezeptor auf der Zelloberfläche und kann über unterschiedliche Abläufe Signale z.B. hinsichtlich Apoptose, Pro-Apoptose oder Anti-Apoptose in die Zelle transferieren. Dies sind Signalkaskaden mit unterschiedlichen Kinasen wie FAK

(*focal adhesion kinase*), MEK (*MAPK-ERKinase*), ERK (*extracellular signal-related kinase*), PI₃K (*Phosphoinositol-3-Kinase*) oder Akt (*serine-threonine kinase*) (Tang, Nakada et al. 2006). Unter diesen Signalwegen finden sich von EMMPRIN aktiviert auch Funktionen zur Überlebensstrategie von Zellen (Zucker, Hymowitz et al. 2001). Die erwähnten Cyclophiline haben insbesondere auch Einfluss auf die Expression von EMMPRIN auf Oberflächen von Zellen (Yurchenko, O'Connor et al. 2001). Zusammengefasst lässt sich aufgrund der komplexen Interaktionen mit den verschiedensten Proteinen in der Transmembranregion der Zellen die Existenz eines „*CD147-based supercomplex*“ vermuten (Weidle, Scheuer et al. 2010).

1.2.2.2 Glykosyliertes EMMPRIN als Induktor für MMPs und für die Angiogenese

Unter den zahlreichen intermolekularen Funktionen ist bisher die durch EMMPRIN induzierte Expression von Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) auf Tumorzellen und Fibroblasten intensiv erforscht worden (Biswas, Zhang et al. 1995; Millimaggi, Mari et al. 2007). MMPs sind funktionell wichtige Proteinasen innerhalb der Tumorentstehung und –progression. Sie bauen Proteine der extrazellulären Matrix proteolytisch ab und um, ermöglichen die Zellmotilität und wirken bei der Signaltransduktion zwischen den Zellen mit. Beim Abbau der extrazellulären Matrix durch MMPs können proteolytisch verschiedene Wachstumsfaktoren freigesetzt werden, welche zum Wachstum und der Migration von Tumorzellen beitragen (Egeblad and Werb 2002). EMMPRIN wirkt, wie die Bezeichnung schon impliziert, bei der Aktivierung von verschiedenen MMPs in unterschiedlicher Intensität mit. Vor allem die MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-14 und MMP-15 werden stimuliert. Es wurde gezeigt, dass eine physiologische oder pathologische Überexpression von EMMPRIN mit einer erhöhten MMP-Expression vergesellschaftet ist (Zhou, Zhu et al. 2005). Der Mechanismus, mit dem die Tumorzellen die EMMPRIN-Expression und konsekutiv die Induktion der MMP-Expression regulieren, ist jedoch erst in Ansätzen geklärt (Gabison, Hoang-Xuan et al. 2005). Im Modell von Menashi et al. wird auf Wirkung des „epithelial growth factor“ (EGF) der entsprechende Rezeptor an der Zelloberfläche aktiv und induziert die EMMRPIN-Expression im Inneren der Zelle (Menashi, Serova et al. 2003). An die Zelloberfläche transportiert kann EMMPRIN nun über auto- oder parakrine Signaltransduktion an der eigenen Zelle oder auf Nachbarzellen die MMP-Expression induzieren.

In welcher Weise die unterschiedlichen Glykosylierungs-Varianten von EMMPRIN die MMP-Expression und –Aktivität induzieren, soll folgendes nach Tang et al. modifiziertes Schema (Abbildung 3) verdeutlichen (Tang, Chang et al. 2004):

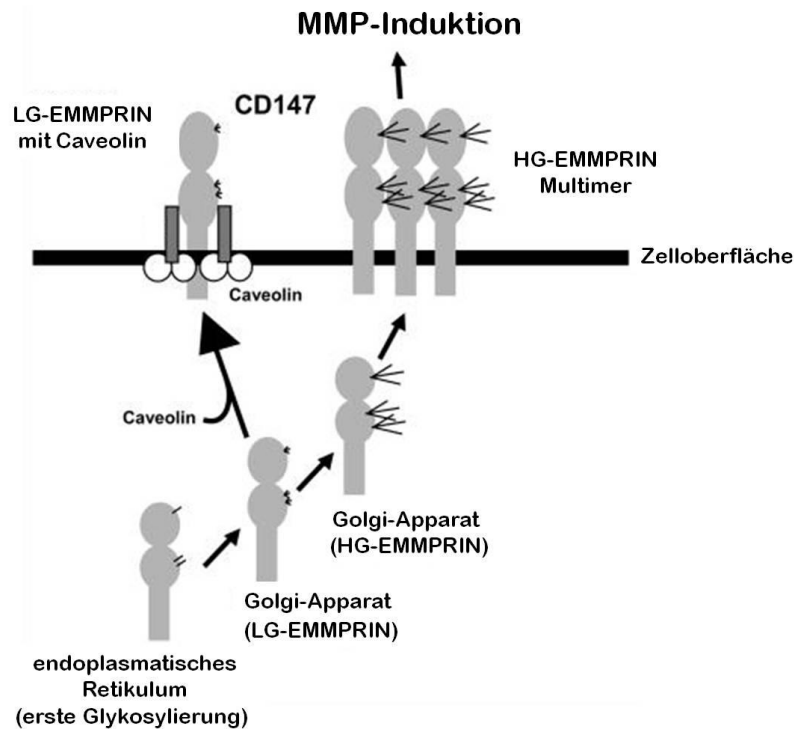


Abbildung 3: Glykosylierung von EMMPRIN und MMP-Induktion: Nach der Proteinsynthese wird EMMPRIN im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat glykosyliert. Dabei ist die Anwesenheit von Caveolin-1 ein entscheidender Faktor, der den Grad der Glykosylierung bestimmt: Unter Einfluss von Caveolin-1 bleibt EMMPRIN mit geringer Glykosylierung an der Zelloberfläche als Monomer funktionell inaktiv. Erfolgt die Glykosylierung mit langen Polysaccharidseitenketten, dann kann EMMPRIN als Multimer an der Zelloberfläche u.a. MMP induzieren (Tang, Chang et al. 2004). LG=low glycosylated; HG=high glycosylated EMMPRIN.

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass die EMMPRIN-Aktivität durch verschiedene Glykosylierungsstufen am N-terminalen Ende reguliert wird (Yu, Jiang et al. 2006). Man geht von einer „*low-glycosylated*“ und einer „*high-glycosylated*“ EMMPRIN-Variante aus, welche im Folgenden mit LG (32-44 kDa) und HG-EMMPRIN (45-65 kDa) bezeichnet werden (Tang und Hemler 2004). Die Glykosylierung mit Polysaccharidketten ist für die Signalaktivierung (Gabison, Hoang-Xuan et al. 2005) und die Bildung von funktionellen EMMPRIN-Multimeren essentiell. Membrangebundene Kofaktoren wie Caveolin-1 regulieren durch Hemmung weiterer Glykosylierung die Aktivität von EMMPRIN (Yan, Zucker et al. 2005). Caveolin-1 blockiert als Plasmamembranprotein die vollständige Glykosylierung von HG-EMMPRIN und inhibiert somit die EMMPRIN-vermittelte MMP-Induktion (Tang und Hemler 2004).

EMMPRIN stimuliert parakrin benachbarte Fibroblasten, Endothel- und Tumorzellen zur Produktion von Matrix-Metallo-Proteinase (MMP) (Suzuki, Sato et al. 2004) und spielt damit für die MMP-vermittelte Degradierung von Basalmembranen und das Umgestalten der extrazellulären Matrix eine essentielle Rolle. Das ist Voraussetzung für die Migration von Endothelzellen und hierdurch wird u.a. die Invasivität z.B. im Rahmen der Tumorangiogenese und damit die Malignität einer Tumorzelle beeinflusst.

Desweiteren sind die MMP wichtige Faktoren bei der Angiogenese (Kessenbrock, Plaks et al. 2010), welche das Tumorwachstum in Gefäße des Blut- und Lymphsystem und die Metastasierung in entfernt liegende Organe ermöglicht. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde beschrieben, dass EMMPRIN über die Expression von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und Hyaluronsäure eine verstärkte Angiogenese (Zucker, Hymowitz et al. 2001; Zheng, Takahashi et al. 2006) induziert. Es wurde zusätzlich gezeigt, dass EMMPRIN die VEGF-Produktion sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene induziert (Tang, Nakada et al. 2005). Diese EMMPRIN-vermittelte Regulation der VEGF Produktion erfolgt über den PI3K-Akt Signalweg (Tang, Nakada et al. 2006). Es besteht also eine positive Korrelation zwischen der VEGF- und der EMMPRIN-Expression. Eine Herunterregulierung der EMMPRIN-Expression führte über die Inhibierung der VEGF-Expression zu einer verminderten Dichte der Mikrovaskulatur sowie zur Suppression der Tumorprogression in Tumoren (Chen, Mi et al. 2006).

1.2.3 EMMPRIN als Target-Molekül für Therapien

Die Tatsache, dass EMMPRIN die Tumorangiogenese stimuliert, macht es zu einem attraktiven Zielmolekül innerhalb der Tumorthérapien. Für den therapeutischen Einsatz von EMMPRIN gibt es zwei Strategien: Entweder man nutzt EMMPRIN als Zelloberflächenmolekül für eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern oder man reguliert z.B. über RNA-Interferenz direkt die Synthese von EMMPRIN in den entsprechenden Tumorzellen. Letztgenannte Idee beinhaltet die Schwierigkeit, zielgerichtet mit einem Medikament direkt an den Tumorzellen anzugreifen.

2006 führte die Arbeitsgruppe um Xu umfangreiche Untersuchungen mit einem monoklonalen Antikörper (HAb18G/Metuximab/Licartin) gegen EMMPRIN in einem murinen Leberkarzinom-Xenograft-Tiermodell durch. Es zeigte sich ein geringeres Tumorwachstum und eine reduzierte Expression der MMP (Xu, Xu et al. 2007). In einer ersten Phase-II-Studie führte diese Forschergruppe 2007 eine Behandlung mit

dem ^{131}I -HAb18G/Metuximab-Antikörper bei Patienten mit Leberzellkarzinom durch. Von 73 Patienten zeigten 27% ein Ansprechen auf die Therapie in Form der Größenabnahme des Tumors. Bei weiteren 58% konnte eine Stabilisierung der Tumorerkrankung erzielt werden (Chen, Mi et al. 2006). Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass nach orthotoper Lebertransplantation bei fortgeschrittenen Leberzellkarzinompatienten die Rezidivrate und das Gesamtüberleben nach einem Jahr deutlich besser waren, wenn sich die Patienten nach der Transplantation einer dreimaligen intravenösen Behandlung mit diesem monoklonalen Antikörper gegen EMMPRIN unterzogen (Xu, Shen et al. 2007).

Durch seine anti-apoptotische und chemoresistente Wirkung wurde EMMPRIN als Zielmolekül bei der Optimierung von Chemotherapeutika interessant. Durch RNA-Interferenz mittels shRNA wurde in vitro die EMMPRIN-Expression in humanen Karzinomzellen (OvarialCa und LarynxCa) reduziert und im Mausmodell zeigte sich ein verbessertes Ansprechen auf das jeweilige Chemotherapeutikum (Paclitaxel bzw. Cisplatin) (Zou, Yang et al. 2007; Zhu, Pan et al. 2011). Medikamentöse Wirkstoffe gegen EMMPRIN könnten somit eine Sensibilisierung von Tumorzellen vor einer Chemotherapie hervorrufen und das Ansprechen und die Erfolgsquote von Tumortherapien verbessern. Ebenso existieren für andere Tumorentitäten wie Maligne Melanome, Kopf- und Halskarzinome oder Lungenkarzinome bislang nur präklinische Daten in murinen Xenograftmodellen, die alle zeigen, dass die Inaktivierung von EMMPRIN mittels Antikörpern oder siRNA zu einer Verringerung des Tumorwachstums führte (Dean, Newman et al. 2009; Kanekura und Chen 2010; Sidhu, Nawroth et al. 2010).

Somit stellt EMMPRIN möglicherweise ein erfolgversprechendes neues Molekül in der Tumortherapie dar.

1.2.4 EMMPRIN im humanen Harnblasenkarzinom

Die Malignität einer Karzinomzelle hängt entscheidend von der Variabilität der Zytoskelett-Architektur, der Expression von Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche und der Fähigkeit zur Durchdringung der Basalmembran ab. Das multifunktionale EMMPRIN wirkt bei all diesen Prozessen durch seinen Einfluss auf den MMP-induzierten Umbau der extrazellulären Matrix mit.

Es wurde in mehreren immunhistologischen Studien gezeigt, dass EMMPRIN auch im humanen Harnblasenkarzinom exprimiert wird. Schon 1993 publizierte die Arbeitsgruppe um Muraoka, dass EMMPRIN im Transitionalzell-Karzinom verstärkt

exprimiert wird im Vergleich zu gesundem Urothel (Muraoka, Nabeshima et al. 1993). Eine umfangreiche Studie mit mehreren TissueMiroArrays (TMA) zeigte im humanen Mamma-Karzinom eine positive EMMPRIN-Expression in 67,76% der untersuchten Gewebe (Li, Xu et al. 2009). Im Vergleich hierzu waren die EMMPRIN-Expressionsraten in normalem Epithel bei 5,18% und im Urothelkarzinom deutlich höher bei 85% (Li, Xu et al. 2009). Dies weist ebenso auf eine Schlüsselposition von EMMPRIN im Harnblasenkarzinom hin.

Eine Analyse der GEO-Datenbank (Barrett und Edgar, 2006) zeigt folgende Ausprägung der EMMPRIN-Expression im humanen Harnblasenkarzinomgewebe (Weidle, Scheuer et al. 2010):

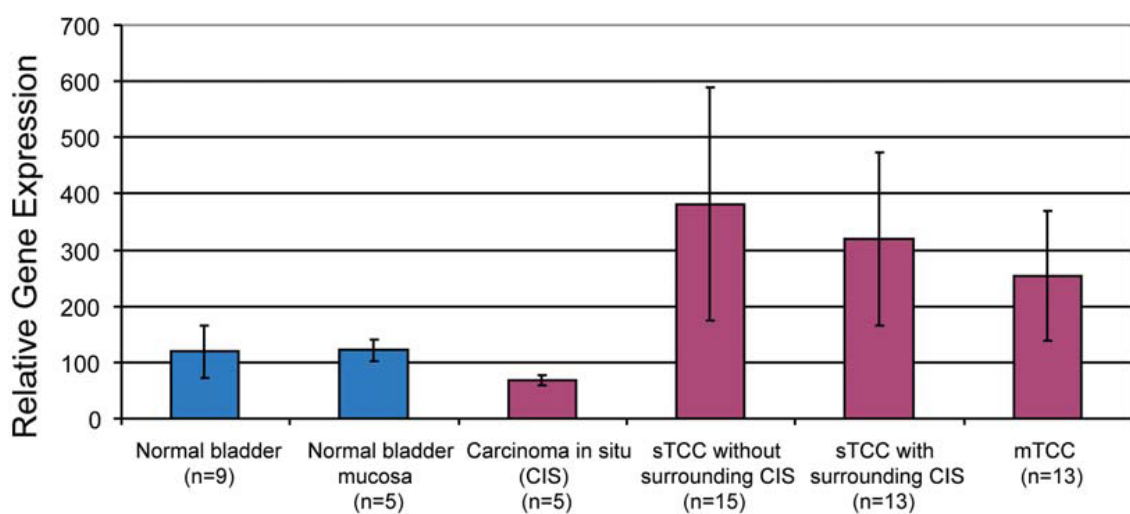


Diagramm 1: EMMPRIN-Expression auf RNA-Ebene im Urothelkarzinom im Vergleich zu gesundem Harnblasengewebe: Daten der Gen-Expression aus der GEO-Datenbank (GSE3167). Die relativen Zahlen wurden aus mehreren ausgewählten Studien gemittelt (GSE7476, E-TABM-147); n=Anzahl der Proben aus jeder Gruppe, CIS=Carcinoma in situ, sTCC=superficial transitional cell carcinoma, mTCC=muscle invasive transitional cell carcinoma (Weidle, Scheuer et al. 2010).

Die EMMPRIN-Expression auf RNA-Ebene ist sowohl im oberflächlichen als auch im muskelinvasiven Urothelkarzinom deutlich höher als in physiologischer Blasenmucosa oder in dem noch nicht die Lamina muscularis mucosae überschreitenden Carcinoma in situ.

Dieser Einfluss der EMMPRIN-Expression auf die invasive Tumorausdehnung wurde in den letzten Jahren durch Tissue-Micro-Arrays von verschiedenen Arbeitsgruppen bestätigt (Riethdorf, Reimers et al. 2006; Han, He et al. 2010). Es wurde postuliert, dass die EMMPRIN-Expression als unabhängiger prognostischer Marker sowohl für das rezidivfreie Überleben als auch für das Gesamtüberleben von Patienten mit Harnblasenkarzinom betrachtet werden kann (Als, Dyrskjot et al. 2007; Xue, Lu et al. 2010). Patienten mit Blasenkrebs entwickeln also trotz adäquater Therapie früher ein

Tumorrezidiv und haben eine schlechtere Prognose, wenn der Primärtumor sich durch eine deutliche EMMPRIN-Expression auszeichnet. Das Gesamtüberleben der Patienten ist insbesondere dann als ungünstig zu beurteilen, wenn in einem fortgeschrittenen Tumorstadium mit Metastasen eine verstärkte EMMPRIN-Expression nachgewiesen wird. EMMPRIN scheint also eine zentrale Rolle in der Progression des humanen Harnblasenkarzinoms zu spielen und könnte somit nicht nur als prognostischer Marker, sondern auch als Target-Molekül in zukünftigen Therapie-Strategien gegen das humane Harnblasenkarzinom genutzt werden.

1.3 Fragestellung

Tumorentstehung, -progression und -metastasierung ist ein komplexer Prozess im menschlichen Körper, an welchem die unterschiedlichsten Moleküle auf und in Zellen beteiligt sind. EMMPRIN scheint als Transmembran-Protein an der Zelloberfläche im gesunden Organismus sowie bei malignen Prozessen sowohl Einfluss auf Signaltransduktionskaskaden als auch auf die Steuerung von Zell-Zellkontakten untereinander zu haben. In verschiedenen Tumorentitäten wurden bisher die Expression von EMMPRIN (Riethdorf, Reimers et al. 2006) und seine Rolle in der Malignisierung von Tumorzellen (Yan, Zucker et al. 2005) erforscht. Wir wollten in dieser Arbeit funktionelle Aspekte von EMMPRIN in der Biologie des Urothelkarzinoms in vitro untersuchen.

Als Basis diente ein Zellkulturmodell von insgesamt neun, hinsichtlich ihrer genetischen Eigenschaften und ihrer Malignität verschiedenen Harnblasenkarzinomzelllinien. In diesen Zelllinien wurde mittels verschiedener genetischer Methoden die Expression von EMMPRIN moduliert. Anschließend untersuchten wir die funktionellen Auswirkungen dieser Modifikationen hinsichtlich ihres Einflusses auf Proliferation, Migration, Apoptoseverhalten und Metabolismus. Aus diesen Experimenten sollten sich wichtige Hinweise zum Verständnis der Tumorbiologie des Harnblasenkarzinoms ergeben.

Die Resultate der geplanten Versuchsvorhaben sollten nicht nur zum besseren Verständnis der Funktion von EMMPRIN in der Tumorprogression des Harnblasenkarzinoms beitragen, sondern auch das Potenzial von EMMPRIN als mögliches therapeutisches Target-Molekül aufzeigen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen SIGMA-Aldrich (Saint Louis Missouri, USA), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 verwendete Puffer, Lösungen und Medien

| | | |
|-------------------------|---|---------|
| BSA | 1mM EDTA, 20mM Na ₂ HPO ₄ ; 1% SDS | |
| DMSO | Bestell-Nr. 1.02931.1000 (Merck) | |
| HBS 2x | 8g NaCl, 0,38g KCl, 0,1g Na ₂ HPO ₄ , 5g Hepes, 1g Glucose, ad 500 ml A.d. | pH 7,05 |
| LB-Medium | 10g Bacto-Tryptone, 5g BactoYeast extract, 10g NaCl, A.d. ad 1l | |
| PBS-Dulbecco 10x | w/o Ca ²⁺ ; Mg ²⁺ ; low endotoxin (v. Biochrom; Cat.No.L1835) | |
| SOC-Medium | 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Trypton, 10 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Kaliumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Magnesiumsulfat, 20 mM einer 2 M Mg ²⁺ -Lösung | pH 6,8 |
| TBE | 108g Tris-Base, 55g Bor-Säure, 40ml EDTA (0,5mol), ad 1000ml A.d. | pH 8,0 |

Tabelle 3: Puffer, Lösungen, Medien

2.1.3 Antikörper

| Spezies | Antigen | Klonname | Verdünnung | Herkunft |
|----------------|--------------------------|-----------------|-------------------|-----------------------------|
| Maus | EMMPRIN / CD 147 (human) | HIM6 | 1:5.000 | Santa Cruz Bio., Heidelberg |
| Kaninchen | β-Actin | Anti-Actin | 1:5.000 | Sigma, Saint Louis |

Tabelle 4: Monoklonale Primärantikörper

| Spezies | Antigen | Konjugat | Verdünnung | Herkunft |
|----------------|-----------------------|-----------------|-------------------|------------------|
| Esel | Maus, Ig G (H+L) | Peroxidase | 1:10.000 | Dianova, Jackson |
| Esel | Kaninchen, Ig G (H+L) | Peroxidase | 1:10.000 | Dianova, Jackson |

Tabelle 5: Sekundärantikörper

2.1.4 Plasmide & Vektoren

| Name | Referenz |
|---------------------------|---|
| pENTR TM H1/TO | Invitrogen - Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| pENTR-EMMPsh1 | s. <i>Material und Methoden 2.3.1.1</i> |
| pENTR-EMMPsh2 | s. <i>Material und Methoden 2.3.1.1</i> |
| pENTR-EMMPsh3 | s. <i>Material und Methoden 2.3.1.1</i> |
| pENTR-lacZ2.1 | Invitrogen - Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| pLVTHM | Trono Lab, Lausanne - Schweiz |
| pLVTHM-EMMPsh2 | Vgl. (Sidhu, Nawroth et al. 2010), Oncogene 29 |
| psPAX2 | Trono Lab, Lausanne - Schweiz |
| pRSV-Rev | Trono Lab, Lausanne - Schweiz |
| pMD2.G | Trono Lab, Lausanne - Schweiz |
| pTRE2hyg | Takara Bio Europe / Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France |
| pTRE2hyg-HEMMP | Takara Bio Europe / Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France |
| pRenilla | Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland |

Tabelle 6: Plasmide und Vektoren

2.1.5 siRNA-Oligonukleotide

Sequenzen siehe (Sidhu, Nawroth et al. 2010).

| Name | Oligonukleotid-Sequenz | Referenz |
|-------------|--|---|
| EMMPsi1 | 5'ACCGGTCAGAGCTACACATTGATTCAAG AGATCAATGTGTAGCTCTGACCGG 3' 5'CCGGTCAGAGCTACACATTGATCTCTTG AATCAATGTGTAGCTCTGACCGGT 3' | synthetisiert von MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland |
| EMMPsi2 | 5'AGACGGCCATGCTGGTCTGCAATTCAA GAGATTGCAGACCAGCATGGCCGTC 3' 5'GACGCCATGCTGGTCTGCAATCTCTTGA ATTGCAGACCAGCATGGCCGTCT 3' | synthetisiert von MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland |
| EMMPsi3 | 5'AGTCGTCAGAACACATCAACTTCAAGAG AGTTGATGTGTTCTGACGAC 3' 5'GTCGTCAGAACACATCAACTCTCTTGAA | synthetisiert von MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland |

| | | |
|----------|--|---|
| | GTTGATGTGTTCTGACGACT 3' | |
| ctrl.-si | 5'AAATCGCTGATTTGTGTAGTCGGAGACG ACTACACAAATCAGCGA 3' 5'TCGCTGATTTGTGTAGTCGTCTCCGACT ACACAAATCAGCGATTT 3' | synthetisiert von MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland |

Tabelle 7: Oligonukleotide

2.1.6 Geräte

| | |
|---|--------------------------------------|
| Absaugpumpe Typ: N811KN.18 | KNF Neuberger NeoLab, Freiburg i.Br. |
| Analysewaage Sartorius Typ 2254 | Sartorius, Göttingen |
| Analysewaage Mettler AT250 | Mettler-Toledo, Giessen |
| Autoklav Sytec Dx-65 | Systec, Wettenberg |
| Autoklav Tuttnauer 2540EL | Tuttnauer, EH Breda Netherlands |
| Blockthermostat BT100 | Kleinfeld, Gehrden |
| CO ₂ -Inkubator HeraCell 240 | Thermo-Heraeus, Hanau |
| Cryo 1°C Freezing Container „Mr. Frosty“ | Nalgene Labware, New York USA |
| Digitalkamera Canon EOS 10D | Canon, Krefeld |
| Durchlichtmikroskop Axiovert 135 | Zeiss, Jena |
| Durchlichtmikroskop Diavert | Leitz, Wetzlar |
| Eismaschine Ziegra | Ziegra, Isernhagen |
| Electrophoresis Power Supply-EPS 600 | Pharmacia, London England |
| Elektrophorese-Netzgerät PowerPac HC | Bio-Rad, München |
| Elektrophorese Mini PROTEAN® System | Bio-Rad, München |
| Elektrophorese-Kammer | PEQLAB Biotechnologies, Erlangen |
| ELISA-Reader kinetic microplate reader v-max | Molecular Devices, Sunnyvale USA |
| FACScan Flow Cytometer | BD Biosciences, Heidelberg |
| Filmentwickler AGFA CP 1000 | AGFA HealthCare, Bonn |
| Fluoreszenzmikroskop Olympus BH2 | Olympus, Hamburg |
| Gefrierschrank Bosch GSP 36 A 31 | Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe |
| Geldokumentationssystem XR | Bio-Rad, München |
| Kühlschrank Liebherr comfort | Liebherr, Biberach a.d. Riss |
| Luminometer (Luziferase-Messgerät) | Promega, Mannheim |

| | |
|---|---|
| Magnetrührer mit Heizung RCT | IKA, Staufen |
| Mikrowelle (handelsüblich) | Panasonic, Hamburg |
| pH-Meter 691 | Metrohm, Filderstadt |
| Photometer, BIO | Eppendorf, Hamburg |
| Pipetten: pipetman P20, P200, P1000 | Gilson, Middleton, USA |
| Pipettierhilfe accu-jet | Brand, Wertheim |
| Reinluftwerkbank HERA Safe | Thermo-Scientific, Bremen |
| Reinstwassersystem PureWater Option 4 | ELGA Berkefeld, Celle |
| Rollenmischgerät 348 „Assistant“, RM 5 | Assistent, Sondheim |
| Schüttelinkubator KS-15 mit Inkubationshaube Th-15 | Edmund-Bühler, Hechingen |
| Schüttler Hybriturn, Modell: 002041 | Hybritech, Deutschland |
| Sterilbank HeraSafe | Thermo-Heraeus, Hanau |
| Sterilisator Heraeus UT20 | Thermo-Heraeus, Hanau |
| Stickstofftank XLC 230 | MVE Cryogenics, Memphis, Tennessee |
| Thermomixer comfort | Eppendorf, Hamburg |
| The Coult Mixer | Denley Instruments, Colchester England |
| Tiefkühlagerschrank -80°C HERAfreeze HFU 586 Basic | Thermo-Heraeus, Hanau |
| Trockenschrank Heraeus B 6030 | Kendro, Langenselbold |
| Ultraschallreinigungsgerät Sonorex RK103H | Bandelin, Berlin |
| Vortex, MS2 Minishaker | IKA, Staufen |
| Wasserbad | Memmert, Schwabach |
| Zentrifuge Rotina 22R | Hettich, Tuttlingen |
| Zentrifuge Rotina 35R | Hettich, Tuttlingen |
| Zentrifuge Rotina 46RS | Hettich, Tuttlingen |
| Zentrifuge 5415 R | Eppendorf, Hamburg |

Tabelle 8: Geräte

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|--|
| 3MM-Whatmann-Blotting Filterpapier | Schleicher&Schüll, Bioscience Dassel |
| Agarose | Invitrogen, Karlsruhe |
| CEA-Röntgenfilme 13x18 bzw. 18x24 | Ernst Christiansen, Planegg |
| ECL Plus Western Blotting Detection Kit | Amersham™ Biosciences – GE Healthcare, Buckinghamshire UK |
| FACS-Röhrchen | BD Biosciences, Heidelberg |
| Magermilchpulver „Bio“ (handelsüblich) | Heirler Cenovis, Radolfzell |
| Papiertücher Kimwipes® Lite | Kimberly-Clark Europe, Northop, UK |
| Parafilm „M“ Laboratory Film | Alcan Packaging, Neenah USA |
| Pasteurpipetten, einmal (Glas) | OMNILAB, München |
| Pipettenspitzen | Gilson, Middleton, USA |
| PS-Microplate, 96 well, Flat Bottom | Greiner bio-one, Frickenhausen |
| PVDF-Membran Immobilon P® 0,45 µm | Millipore, Eschborn |
| Zellschaber Costar Cell-Lifter&Scraper | Corning, New York USA |
| Klonierungsringe – cloning rings | Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg |

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

2.2 Zellkulturmethoden

2.2.1 Herkunft der Zelllinien

Für die Zellkulturmodelle wurden diverse humane Harnblasenkarzinomzelllinien (Williams 1980; Masters, Hepburn et al. 1986) verwendet, über deren Herkunft und Eigenschaften die Tabelle 10 Auskunft gibt. CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovarial Cells aus *Cricetulus griseus*) dienten als Modellzellen in Vorversuchen für das Festlegen von Transfektionbedingungen und wurden von der Firma LGC⁷/ATCC⁸, Wesel bezogen.

⁷ LGC: Laboratory of the Government Chemistry

⁸ ATCC: American Type Culture Collection

| Zellname | Tumorart-Zelltyp | Kulturbedingungen | Herkunft | Identifikations-Nr. |
|-----------------|--|---|---|------------------------------------|
| RT 112 | Urothelkarzinom, human, superficial | Heraeus Brutschrank, 37°C, 5% CO ₂ , wasser-gesättigte Atmosphäre, RPMI-Medium | CLS ⁹ , Eppelheim | DSMZ ¹⁰ : ACC-418 |
| T 24 | Urothelkarzinom, human, Grading G3, invasiv | Heraeus Brutschrank, 37°C, 5% CO ₂ , wasser-gesättigte Atmosphäre, RPMI-Medium | CLS, Eppelheim | ATCC: HTB-4 |
| HT 1376 | Urothelkarzinom, human, Grading G3, Staging T2 | Heraeus Brutschrank, 37°C, 5% CO ₂ , wasser-gesättigte Atmosphäre, DMEM-Medium | Forschungslabor der Klinik für Urologie & Kinderurologie Universitätsklinikum Saarland, Homburg | ATCC: CRL-1472 |
| EJ 28 | Urothelkarzinom, human | Heraeus Brutschrank, 37°C, 5% CO ₂ , wasser-gesättigte Atmosphäre, RPMI-Medium | CLS, Eppelheim | CLS-Bestell-Nr. 300172 bzw. 330172 |
| RT 4 | Urothelkarzinom, human, Grading G1, Staging T4 | Heraeus Brutschrank, 37°C, 5% CO ₂ , wasser-gesättigte Atmosphäre, RPMI-Medium | CLS, Eppelheim | ATCC: HTB-2 |
| 647 V | Urothelkarzinom, human, Grading G2 | Heraeus Brutschrank, 37°C, 5% CO ₂ , wasser-gesättigte Atmosphäre, RPMI-Medium | Dr. Jackse, Innsbruck | ATCC: 414 |
| 486 P | Urothelkarzinom, human, Grading G4 | Heraeus Brutschrank, 37°C, 5% CO ₂ , wasser-gesättigte Atmosphäre, RPMI-Medium | Forschungslabor der Klinik für Urologie & Kinderurologie Universitätsklinikum Saarland, Homburg | |
| 253 J | Urothelkarzinom, human, retroperitoneale | Heraeus Brutschrank, 37°C, 5% CO ₂ , wasser-gesättigte Atmosphäre, | Forschungslabor der Klinik für Urologie & | |

⁹ CLS: Cell Line Service¹⁰ DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

| | | | | |
|------------------|--|---|--|----------------|
| | LN-Metastase, Grading G4, Staging T4 | DMEM-Medium | Kinderurologie Universitätskli- nikum Saar- land, Homburg | |
| HEK-293 T | embryonale Nierenzelle, human | Heraeus Brutschrank, 37°C, 5% CO ₂ , wasser- gesättigte Atmosphäre, DMEM-Medium | CLS, Eppelheim | ATCC: CRL-1573 |

Tabelle 10: verwendete Harnblasenkarzinomzelllinien

2.2.2 Kulturmedien

Verwendete Vollmedien:

RPMI-Medium:

- 500 ml RPMI Medium (Biochrom AG, Berlin)
 - 10 % (v/v) Fötale Rinderserum (FBS) (Biochrom AG, Berlin)
 - 1 % (v/v) Antibiotic Antimycotic Solution (100x) (PenStrep)
10.000 U Penicillin, 10 mg Streptomycin, 25 µg Amphotericin B
pro ml (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
 - 1 % (v/v) nicht essentielle Aminosäuren (NEA) (Biochrom AG, Berlin)
- Im RPMI-Medium wurden die Zelllinien CHO, RT112, RT4, T24, EJ28, 647V und 486P kultiviert.

DMEM-Medium:

- 500 ml DMEM Medium (Gibco, Eggenstein)
 - 10 % (v/v) FBS (Biochrom AG, Berlin)
 - 1 % (v/v) PenStrep (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
 - 1 % (v/v) NEA (Biochrom AG, Berlin)
- Im DMEM-Medium wurden die Zelllinien HT1376, 253J und 293T kultiviert.

LB-Medium:

- 10g Bacto-Tryptone
- 5g BactoYeast extract
- 10g NaCl
- ad 1l A.d.

Glycerolstock:

- 5 ml Bakterien-Vorkultur O/N 37 °C

davon 800 µl Bakterienkultur + 200 µl Glycerol 50%
mit Pipette mischen + bei -80°C lagern

Trypsin/EDTA-Lösung zum proteolytischen Ablösen der Zellen:

Trypsin in PBS 0,05 % / 0,02 % (w/v), w/o Ca²⁺, Mg²⁺ (Biochrom AG, Berlin)

Waschen des Zellrasens mit:

PBS-Dulbecoo (1x) w/o Ca²⁺, Mg²⁺; LE (Low Endotoxin) (Biochrom AG, Berlin)

Einfriermedium:

50% (v/v) Vollmedium ohne PenStrep,

10% (v/v) DMSO Dimethylsulfoxid getrocknet (max. 0,05% H₂O) (Merck,
Darmstadt)

40% (v/v) Fötiales Rinderserum (FBS)

2.2.3 Kulturbedingungen

Sämtliche Arbeitsgänge wurden in einer Reinluftwerkbank Modell HERA Safe der Firma Thermo-Scientific (Bremen, Deutschland) unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt.

Alle Zelllinien wurden in sterilen Kulturflaschen oder –schalen kultiviert (s. Tabelle 11). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem HeraCell240-Brutschrank (Heraeus) bei 37 °C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ in RPMI- bzw. in DMEM-Medium. Im Zusammenspiel mit dem Hydrogencarbonatpuffersystem der Medien diente die CO₂-Begasung der Konstanthaltung des pH-Wertes des Mediums. Die hohe Luftfeuchtigkeit verhinderte ein Verdunsten des Mediums. Die Zelllinien wurden zweimal wöchentlich unter sterilen Bedingungen passagiert. Hierzu wurden die adhärent wachsenden Zellen nach Absaugen des Mediums mittels einer sterilen Pasteurpipette einmal mit PBS-Dulbecco gewaschen und anschließend mit vorgewärmter Trypsin/EDTA-Lösung über 5 min. bei 37°C von der Kulturschale proteolytisch abgelöst. Durch seitliches Beklopfen des Zellkulturgefäßes wurde die Ablösung der noch am Boden haftenden Zellen sowie eine Separierung der noch vorhandenen Zellagglomerate in eine weitgehende Einzelzellsuspension erreicht. Es erfolgte eine optische Kontrolle der entstandenen Zellsuspension im Lichtmikroskop. Der Vorgang wurde durch Zugabe von frischem vorgewärmtem Vollmedium abgestoppt und die Zellen wurden 5 min. bei 250 Umdrehungen pro Minute (rpm) zu einem Zellpellet zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde abgesaugt und die in

Medium resuspendierten Zellen wurden dann im Verhältnis 1:5 bzw. 1:10 wieder ausgesät und weiter kultiviert.

| Kulturschale | Oberfläche | Mediumvolumen | Hersteller |
|-----------------------|---------------------|----------------------|----------------------------|
| 96-well-Platte | 0,2 cm ² | 0,1 ml | Cellstar / greiner bio-one |
| 24-well-Platte | 1,9 cm ² | 0,5 ml | Cellstar / greiner bio-one |
| 6-well-Platte | 9,4 cm ² | 2 ml | Cellstar / greiner bio-one |
| 10 cm-Schale | 78 cm ² | 10 ml | Falcon / Becton Dickinson |
| T25-Zellkulturflasche | 25 cm ² | 5 ml | Cellstar / greiner bio-one |
| T75-Zellkulturflasche | 75 cm ² | 15 ml | Cellstar / greiner bio-one |

Tabelle 11: verwendete Kulturschalen

2.2.4 Zellzählung und Vitalitätstest mit Trypanblau

Um definierte Anzahl von Zellen aussäen zu können, wurde die Zellkonzentration in der Suspension mithilfe der Zellzählung im Vitalitätstest mit Trypanblau bestimmt. Dieser Test stützt sich auf die veränderte Membrandurchlässigkeit abgestorbener Zellen, bei der Farbstoff, für den die Zellmembran normalerweise nicht durchlässig ist, aufgenommen wird. Vitale Zellen nehmen Trypanblau nicht auf. Da Trypanblau auf Dauer zytotoxisch wirkt, wurde bei wiederholter Zellauszählung nach über 5 Min. eine erneute Färbung vorgenommen.

Ein sauberes, fettfreies Hämozytometer (Neubauer Zählkammer) wurde mit einem sauberen, fettfreien Deckglas versehen. Das Erscheinen der sogenannten Newton'schen Ringe zeigte an, dass das Deckglas richtig angebracht war.

20 µL der Zellsuspension wurden mit 20 µL einer Trypanblaulösung in einem Eppendorfgefäß zusammengegeben, gemischt und mit einer Pipette wurden 20 µL der angefärbten Suspension luftblasenfrei in die Zählkammer gegeben bis diese vollständig gefüllt war. Bis zur Auszählung wurden 1-2 min abgewartet, damit sich die Zellen am Boden der Zählkammer absetzen konnten. Es wurde die Gesamtzahl der Zellen sowie die Anzahl der blau gefärbten (toten) Zellen bestimmt. Alle Zellen, deren Kern bzw. Zytoplasma eine Blaufärbung zeigten, wurden als angefärbt und damit als tot oder defekt betrachtet. Auch diejenigen Zellen, welche nur eine schwache Blaufärbung des Zellkerns aufwiesen, wurden als tot gezählt.

Die Neubauerzählkammer besteht aus neun großen Quadraten. Jedes Quadrat hat eine Fläche von 1 mm². Da die Höhe zwischen dem Deckglas und dem Objektträger

genau 0,1 mm beträgt, befindet sich ein Volumen von 1 mm x 1 mm x 0,1 mm, das heißt $0,1 \text{ mm}^3$ (oder 0,1 μL) über jedem dieser Quadrate. In jeweils zwei Quadraten dieser Kammer wurden die vitalen Zellen gezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Die Berechnung des prozentualen Anteils der lebenden Zellen erfolgte gemäß folgender Formel 1:

$$N \times 10^4 / \text{ml} = \text{Zellzahl} / \text{ml}$$

N: Mittelwert aus der Zellzahl von zwei ausgezählten Quadraten der Neubauerzählkammer

$10^4 / \text{ml}$: Kammerfaktor (um die Zellzahl in 1 ml Zellsuspension zu erhalten)

Formel 1: Ermittlung der vitalen Zellen in der Neubauer-Zählkammer.

Das notwendige Zellsuspensionsvolumen zur Überführung der entsprechenden Zellzahl wurde in ein neues Zellkulturgefäß mit bereits vorgelegtem erwärmtem Medium pipettiert und die Zellen im Inkubator in neuer Passage bei den oben angegebenen Bedingungen weitergezogen.

2.2.5 Auftauen und Einfrieren eukaryotischer Zellen

Eukaryote Zellen können durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff (-196°C) für lange Zeit gelagert und nach dem Auftauen wieder in Kultur genommen werden. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Um die Bildung von Eiskristallen in den Zellen und damit verbundene toxische Zellschädigung zu verhindern, wird den Zellen durch Zugabe des stark hygroskopischen Dimethylsulfoxids (DMSO) langsam das Wasser entzogen. Mindestens 2×10^6 Zellen in 500 μl Zellsuspension mit Vollmedium wurden mit 500 μl vorbereitetem Einfriermedium (s. 2.2.2 Kulturmedien) vermischt und in Kryotubes (Nunc, Wiesbaden) überführt. Um einen zellschonenden Einfrierprozess zu gewährleisten, wurden diese Eppendorf-Reaktionsgefäße über 24h in *Mr.-Frosty-Freezing-Container* (NALGENE®-Labware) langsam auf -80°C gekühlt. Dies stellte eine langsame Temperatursenkung um 1°C pro Minute sicher. Nach 24h wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff umgelagert.

Um die kryokonservierten Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Zellen nach dem Auftauen (bei RT) mit Vollmedium gewaschen, um das toxische DMSO zu entfernen. Nach Abzentrifugation wurden die Zellen in vorgewärmtem Vollmedium resuspendiert und (nach eventueller Auszählung mit oben beschriebener Methode)

entsprechend dem Bedarf auf 10cm-Schalen oder T25- bzw. T75-Zellkulturflaschen ausgesät.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Klonierung

2.3.1.1 Klonierung von shDNA in Plasmide

Für die Expression doppelsträngiger shRNA (s. 2.4 shRNA-Technologie) wurden jeweils zwei einzelsträngige Oligonukleotid-DNA-Sequenzen synthetisiert. Ein sogenannter „top strand“ mit der Sequenz für die entsprechende shRNA sowie ein zu diesem Strang komplementärer „bottom strand“, die eine entsprechende „stem-loop-stem“-Struktur bilden. Die Einzelstränge wurden mit den gewünschten Sequenzen von der Firma Invitrogen, Karlsruhe, synthetisiert. Tabelle 12 zeigt die Sequenzen der verwendeten shRNA-Stränge:

| shRNA- Einzelstrang | Nukleotidsequenz (s. Sidhu, Nawroth et al. 2010) | Referenz |
|--------------------------------|--|--|
| EMMPsh1-top | 5' CACCACCGGTCAGAGCTACACAT TGATTCAAGAGATCAATGTGTAGCT CTGACCGG 3' | synthetisiert von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| EMMPsh1- bottom | 5' AAAACCGGTCAGAGCTACACATT GATCTCTTGAATCAATGTGTAGCTC TGACCGGT 3' | synthetisiert von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| EMMPsh2-top | 5' CACCAGACGGCCATGCTGGTCTG CAATTCAAGAGATTGCAGACCAGCA TGGCCGTC 3' | synthetisiert von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| EMMPsh2- bottom | 5' AAAAGACGCCATGCTGGTCTGCA ATCTCTTGAATTGCAGACCAGCATG GCCGTCT 3' | synthetisiert von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| EMMPsh3-top | 5' CACCAGTCGTCAGAACACATCAA CTTCAAGAGAGTTGATGTGTTCTGA CGAC 3' | synthetisiert von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| EMMPsh3- bottom | 5' AAAAGTCGTCAGAACACATCAACT CTCTTGAAGTTGATGTGTTCTGACG ACT 3' | synthetisiert von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |

| | | |
|------------------------------|--|--|
| <i>lacZ2.1-top</i> | 5' CACCAAATCGCTGATTTGTGTAGT CGGAGACGACTACACAAATCAGCG A 3' | synthetisiert von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| <i>lacZ2.1-bottom</i> | 5' AAAATCGCTGATTTGTGTAGTCGT CTCCGACTACACAAATCAGCGATTT T 3' | synthetisiert von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |

Tabelle 12: Sequenzen der verwendeten shRNA-Einzelstränge

Um die Klonierung in die Plasmide zu ermöglichen, wurden dem 5'-Ende beider Einzelstränge zusätzlich jeweils 4 Nukleotide angefügt: Dem 5'-Ende des „top strand“ die Nukleotide CACC als komplementäre Überhang-Sequenz zu GTGG, sowie die Nukleotide AAAA dem 5'-Ende des „bottom strand“ komplementär zur Überhang-Sequenz TTTT. Die zwei Einzelstränge wurden anschließend mit den Materialien des Sets von Invitrogen (Block-iT® Inducible H1 RNAi Entry-Vector Kit) gemäß Protokoll zu einer doppelsträngigen shRNA zusammengefügt. Es wurde folgender Puffer verwendet:

25 mM Tris (pH 7,4)
10 mM MgCl₂
50 mM NaCl₂
1 mM DTT
ad 1 ml A.d.

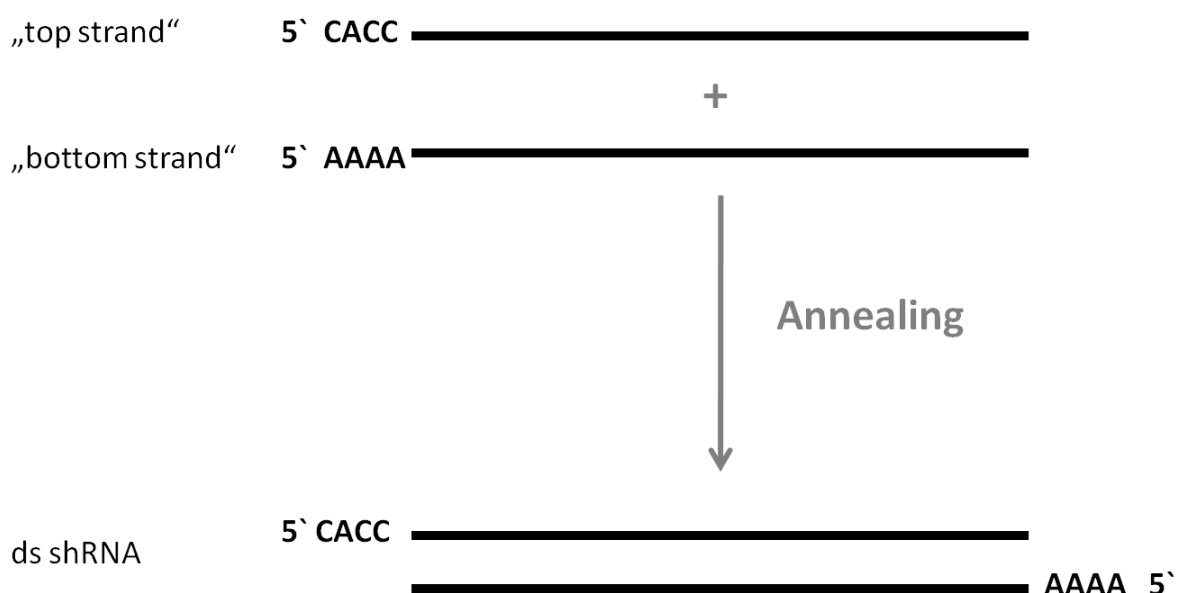


Abbildung 4: Herstellung doppelsträngiger shRNA (Invitrogen): Durch Anlagerung von zwei komplementären Einzelsträngen im Anneling-Prozess entsteht doppelsträngige shRNA.

Das Annealing (Abbildung 4) führten wir bei 95°C für 4 Min. durch und ließen die Doppelstrang-Oligonukleotide für 5-10 Min. bei RT abkühlen.

Zum Reinigen der Oligonukleotide verwendeten wir folgenden Puffer:

| | |
|--------|--------------------|
| 1 mM | EDTA |
| 0,5 mM | NH ₄ Ac |
| 0,01 % | SDS |

Anschließend klonierten wir die doppelsträngigen Oligonukleotide in die entsprechenden Vektoren mit Hilfe von DNA-Ligasen.

2.3.1.2 Verwendete Vektoren

Oligonukleotide mit inserierter EMMPRIN-Sequenz wurden in den pENTRTM/H1/TO Vektor (s. Abbildung 5) kloniert.

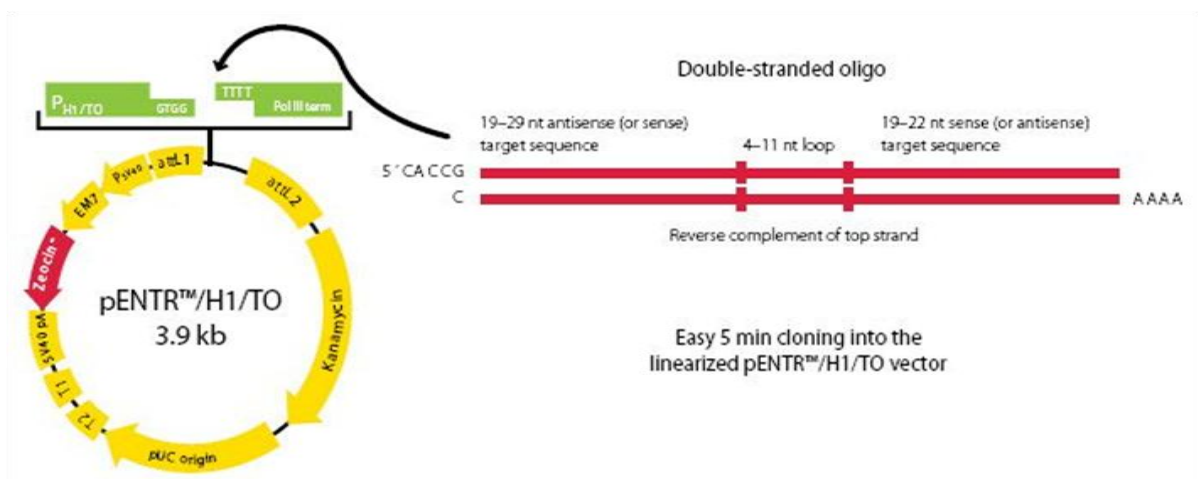


Abbildung 5: Block-iTTM shRNA Entry Vector¹¹ pENTRTM/H1/TO. Der induzierbare shRNA-exprimierender Vektor besteht aus kurzen doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden, welche für die *sense-loop-antisense* Sequenzen des entsprechenden Gens kodieren. Der Entry-Vektor beinhaltet einen H1-Promoter mit zwei Tetrazyklin-Operator-Enden, welche die TATA-Region und die Pol III Terminations-Sequenz flankieren. Kloniert man eine doppelsträngige Oligonukleotid-Sequenz in den Vektor, erhält man eine shRNA-exprimierende RNAi-Kassette.

Der pENTR / H1 / TO ist Bestandteil des BLOCK-iT® Inducible H1 RNAi Entry-Vector Kit der Fa. Invitrogen zur Herstellung eines Entry-Vektors mit den notwendigen Elementen für eine RNA-Polymerase III abhängige, tetrazyklin-regulierte shRNA-Expression. Er enthält eine Klonierungsstelle mit Überhängen der 4 Nucleotide GTGG am Ende des H1/TO-Promotors sowie TTTT zu Beginn des Pol III Terminators für die direkte Klonierung doppelsträngiger shRNA. Der H1/TO-

¹¹ Vgl. Invitrogen, RNAi - Epigenetik und Genregulation unter <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/RNAi-Epigenetics-and-Gen-Regulation/RNAi/Vector-based-RNAi/shRNA-Vectors.html> vom 31.08.2010.

Promotor ist ein modifizierter humaner H1-Promotor, welcher die beiden prokaryotischen Tet-Operator Sequenzen als Grundlage für eine tetrazyklin-regulierte shRNA-Expression enthält (siehe 2.4.4) sowie eine eigene Bindungsstelle für den H1 forward Primer.

Im Rahmen des konditionalen Expressionssystems wurde das Plasmid pTRE2hyg (s. Abbildung 6) als Vektor für EMMPRIN verwendet.

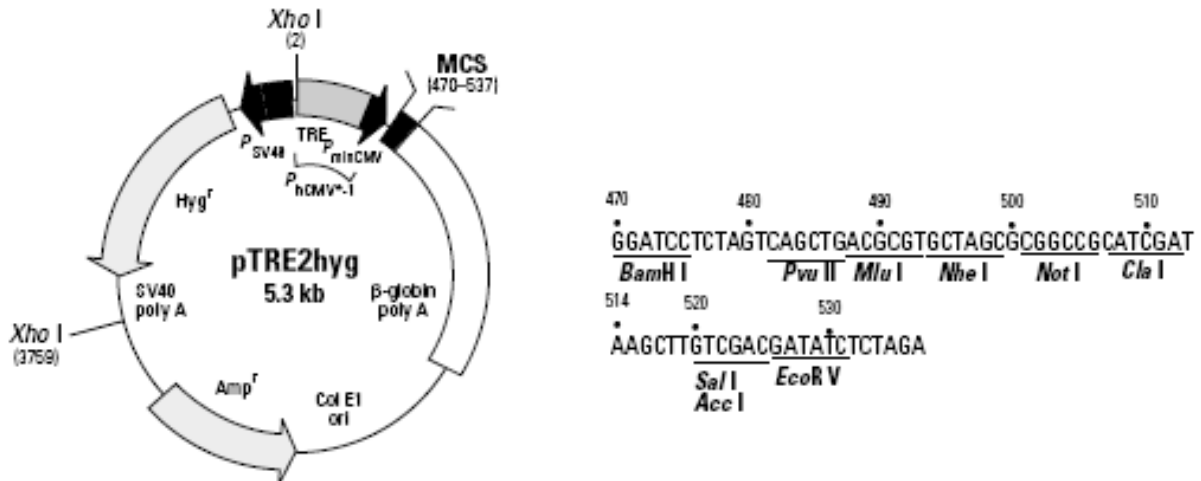


Abbildung 6: Vektorkarte und MCS von pTRE2hyg¹²

2.3.2 Vermehrung und Isolierung von Plasmid-DNA in chemisch kompetenten Bakterien

2.3.2.1 Kultur und Vermehrung von E.coli

Zur Herstellung von Nährböden für die Kultur kompetenter E. coli wurde 1,5 % (w/v) Bacto-Agar (Sigma, Saint Louis USA) zum vorbereiteten LB-Medium gegeben. Das LB-Medium mit Agar wurde autoklaviert und die steril-filtrierte Antibiotika 1 % (v/v) wurden entsprechend den exprimierten Resistenzen des Plasmids den Medien nach Abkühlung unter 50 °C zugefügt. Folgende Antibiotika der Firma Sigma wurden verwendet: Ampicillin 100 µg/ml und Kanamycin 50 µg/ml. Antibiotika haltige Platten wurden bis zu 2 Wochen im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Zur Vermehrung von E. coli wurde flüssiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie von Bakterien auf einer Agarplatte beimpft. Die Anzucht der Bakterien erfolgte dann in einem Rüttelinkubator bei 37 °C und 230 RPM.

¹² Vgl. Tet-Off® and Tet-On® Gene Expression Systems User Manual, S.43 unter http://www.clontech.com/DE/Products/Inducible_Systems/Tetracycline-Inducible_Expression/Systems_1_and_2?sitex=10024:22372:US vom 12.12.2011.

2.3.2.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von freier DNA in kompetente Bakterienzellen. Die Transformation wird molekularbiologisch genutzt, um rekombinante DNA in Bakterien zu vervielfältigen. Die hier verwendeten One Shot® TOP10 Competent *E. coli* Bakterienzellen (Invitrogen, Karlsruhe) werden mit SOC-Medium behandelt, in welchem die darin enthaltenen Ionen eine Milderung der zwischen negativ geladener Membran und negativ geladener DNA wirkenden Abstoßungskräfte bewirken. Anschließend entstehen bei einem kurzen Hitzeschock Poren in der Membran, so dass die Plasmid-DNA in die Zellen aufgenommen werden kann. Auf diese Weise gelingt es, Plasmide zur Expression in prokaryontische Zellen einzuschleusen.

25 µl kompetente Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut, 0,1 - 1 µg Plasmid-DNA in die Transformation eingesetzt, gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock (42 °C für 30 sec) in einem Wasserbad wurden die Bakterien sofort wieder für 30 Sekunden auf Eis inkubiert, anschließend 200 µl SOC-Medium zugegeben und die Eppendorf-Gefäße für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. 20-200µl der transformierten Bakterien wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen, welchen zur Selektion ein entsprechendes Antibiotikum zugesetzt war. Nach kurzem Antrocknen wurden die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert und zwar umgedreht mit der Oberfläche nach unten, um eine mögliche Kontamination durch Kondenswasser oder Luftkeime zu vermindern. Bakterienklone, die den Resistenzmarker exprimieren, überleben.

2.3.2.3 Anlegen von Glycerolstocks

Durch das Anfertigen von Glycerolstocks ist es möglich Bakterien über mehrere Jahre zu lagern. Hierzu wird ein Aliquot einer frischen Bakterienkultur mit 40 Vol% Glycerol versetzt und dann bei -80°C eingefroren.

2.3.2.4 Plasmid-Präparation

Um aus den Bakterien die Plasmid-DNA zu extrahieren, wurde das *HiSpeed® Plasmid Midi and Maxi Kit* der Firma Qiagen (Hilden) verwendet und nach entsprechendem Protokoll des Benutzerhandbuches vorgegangen. Die Methode der Plasmid-Präparation beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterien und chromatographische Reinigung der Zellbestandteile über eine Anionenaustauschersäule (Birnboim and Doly 1979). Es wird hochreine und damit gut sequenzierfähige Plasmid-DNA eluiert.

Zur Vorbereitung wurden in einem Erlenmeyerkolben 100 ml sterilisiertes LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum Kanamycin bzw. Ampicillin (1:1000 von einem 50 mg/ml Stock) versetzt und mit Hilfe einer Pipettenspitze ca. 10 µl von den gefrorenen Glycerolstock-Bakterien dazugegeben. Über 12 - 16 h wurden die Bakterien im Rüttelinkubator (230 RPM) bei 37 °C vermehrt. Am folgenden Tag wurden je 2 x 50 ml dieser Bakterienkultur in der Zentrifuge (20 min, 4000RPM, 4 °C) zentrifugiert und die beiden gewonnenen Pellets mit RNase-Puffer aus dem Kit resuspendiert und gemäß Anleitung der Firma Qiagen weiterverarbeitet.

Im hier angewandten Verfahren erfolgt die alkalische Lyse der Bakterien in einem SDS-haltigen Puffer unter Anwesenheit von RNase. SDS (Natriumdodecylsulfat) solubilisiert Phospholipide und Proteine der Zellmembran und führt dadurch zur Freisetzung der Zellbestandteile. NaOH denaturiert sowohl Proteine und hochgenomische DNA, als auch die Plasmid-DNA. Die RNase führt zur Zerstörung der freiwerdenden RNA. Bei genauem Einhalten der kritischen Lysezeit kommt es bei Neutralisierung mit einem Puffer mit hoher Salzkonzentration zur Ausbildung von Präzipitaten aus SDS, denaturiertem Protein, hochgenomischer DNA und Zelldebris, wobei die gewünschte Plasmid-DNA in Lösung verbleibt und nach Zentrifugation als Überstand abgenommen werden kann. Eine Aufreinigung dieses Überstandes erfolgt dann über eine nur die Plasmid-DNA bindende voräquilibriumierte Säulenmatrix, wobei Reste von RNA und Proteinen mit einem Waschpuffer ausgewaschen werden. Die eluierte Plasmid-DNA wird dann in einer Präzipitation mit Isopropanol gefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach Luftrocknung in TE-Puffer (Tris-EDTA) aufgenommen

2.3.3 Bestimmung des DNA-Gehalts und DNA-Restriktionsverdau

DNA-Präparationen wurden photometrisch im Biophotometer (Eppendorf) quantifiziert und deren Reinheit durch das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm kontrolliert. Für die Messung im Photometer zur Bestimmung des genauen DNA-Gehalts in µg/ml wurden je 2 µl der neu gewonnenen Plasmid-DNA und 48 µl TE-Puffer in einer Messküvette vorbereitet und als Blank-Wert 50 µl reiner TE-Puffer verwendet. Es wurde eine Extinktionsmessung im Spektralphotometer bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm durchgeführt. Dabei bestimmen die aromatischen Purin- und Pyrimidinringe die Absorption bei 260 nm, während die Extinktion bei 280 nm v.a. durch die aromatischen Reste von Proteinverunreinigungen bewirkt wird. Durch die Relation beider Werte lassen sich

somit Rückschlüsse auf die Reinheit der DNA-Präparation ziehen: Ein Quotient der optischen Dichte OD_{260} zu OD_{280} von $\geq 1,8$ gilt dabei als Richtwert für einen hohen Reinheitsgrad der Probe. Die Konzentrationsberechnung selbst erfolgt durch das Photometer nach der Formel 2:

$$c = OD_{260} * e_{DNA} * v$$

| | |
|------------|---|
| c | Konzentration der DNA-Lösung |
| OD_{260} | Extinktion bei 260 nm |
| e_{DNA} | Extinktionskoeffizient von Nukleinsäuren ($0,05 \text{ cm}^2/\text{mol}$) |
| v | Verdünnungsfaktor |

Formel 2: Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Zum Nachweis der spezifischen DNA-Sequenzen in der hergestellten Plasmid-DNA wurde ein DNA-Restriktionsverdau vorgenommen. Als Restriktionsenzym wurden die Restriktionsendonuklease BamHI, EcoRI und XhoI (jeweils 20.000U/ml) verwendet. Der Verdau wurde mit 0,5 μg DNA, 0,1 μl Restriktionsenzym, 2 μl entsprechendem Restriktionsenzym-Puffer und ad 20 μl sterilem A.d. auf Eis nach Vortexen und Zentrifugation bei 37 °C für > 1 h durchgeführt.

2.3.4 Analyse von DNA in der Agarosegelelektrophorese

Zur qualitativen und semi-quantitativen Analyse von Plasmidpräparationen wurde die DNA elektrophoretisch auf Agarosegelen aufgetrennt. Es wurden 0,8 %ige Agarosegele verwendet. Die Agarose (Invitrogen, Karlsruhe) wurde in TBE-Puffer gelöst in der Mikrowelle erhitzt und unter wiederholtem Schütteln zum Aufkochen gebracht. Nach einer kurzen Abkühlphase wurden die flüssigen Gele mit Ethidiumbromid (Sigma, Saint Louis USA) in der Konzentration 5 μl Ethidiumbromid / 100 ml Agarosegel versetzt, blasenfrei in abgedichtete Gelkammern gegossen und mit Kämmen versehen. Nach Verfestigung der Gele (0,5 – 1 h) und Platzierung derselben in Elektrophoresekammern (PEQLAB Biotechnologies, Erlangen) konnten die mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzten Proben auf die Gele geladen werden. Als Größenstandard wurde in allen Gelen als Standard 1 μl eines 100 bp – 10 kb 2 Log Ladders (BioLabs, Ipswich UK) verwendet. Zur Auftrennung der negativ geladenen DNA wurden die Gelelektrophoresekammern anschließend an das Elektrophorese-Netzgerät PowerPac HC (BioRad, München) angeschlossen und für ca. 1-2 h einer Spannung von 100 V ausgesetzt. Die Analyse der DNA-Banden auf dem Gel wurde unter UV-Licht mit dem Geldokumentationssystem XR (BioRad, München)

durchgeführt. Analysiert wurden die Banden mittels der Software ImageJ® (NIH) und QuantityOne® (BioRad).

2.3.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurde das TRIzol®Reagent (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die entsprechenden Zellen wurden in einer T75-Zellkulturflasche oder in einer 10cm-Zellkulturschale ausgesät und bei einer Konfluenz von etwa 80% mittels Trypsinierung geerntet. Das nach der Zentrifugation gewonnene Zellpellet wurde durch die Zugabe von 1 ml TRIzol®Reagent lysiert. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde diese Suspension gut durchmischt und konnte bei Bedarf bei -80°C eingefroren werden. Nach dem Auftauen (5 Min. im Thermomixer 30°C bei 300 rpm) wurde die Suspension mit 200 µl Chloroform versetzt, 15 Sec. kräftig geschüttelt und dann für 3 Min. bei 25°C RT inkubiert. Durch 15-minütige Zentrifugation bei 12.000g erfolgte eine Phasentrennung. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die darin enthaltene RNA durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol gefällt und wiederum für 10 Min. bei 25°C RT inkubiert. Die erneut bei 12.000 g (10 Min. bei 4°C) sedimentierte RNA wurde einmal mit je 1 ml 75% Ethanol gewaschen und dann für 5-10 Min. unter Vakuum im Exsikkator getrocknet. Die RNA wurde in 20-25 µL reinstem Wasser gelöst und im BioPhotometer durch Messung der Extinktion bei 260 nm in einer entsprechenden Verdünnung (1:30-1:100) der RNA-Gehalt bestimmt. Bis zur Erststrangsynthese der cDNA konnte diese bei -80°C gelagert werden.

2.3.6 Synthese der Erststrang-c-DNA

Die Transkription von RNA in die komplementäre cDNA erfolgte mit dem „SuperScript First-Strand Synthesis“-System der Firma Invitrogen. Als Primer wurden Random-Primer in einer Konzentration von $c = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ verwendet. 1-3 µg Gesamt-RNA wurden mit 2 µl Random-Primern in 14 µl Wasser für 5 Min. bei 75°C denaturiert und anschließend sofort für 5 Min. auf Eis bei 4°C abgekühlt. Dann wurden 11 µl Reaktionslösung (5 µl 5-fach Reaktionspuffer; 1,25 µl 10 mM dNTP-Mix; 0,5 µl RNase Inhibitor $c = 40 \text{ U}/\mu\text{l}$) und 0,5 µl der M-MLV RT (Reversen Transkriptase $c = 2.000 \text{ U}/\mu\text{l}$) zur Probe pipettiert und mit der Pipettenspitze oder auf niedriger Stufe im Vortex-Gerät gemischt und vorsichtig abzentrifugiert. Das Umschreiben der RNA in cDNA, d.h. die Anlagerung der Primer an die RNA und Synthese der cDNA aus den entsprechenden Mononukleotiden erfolgte im Multicycler (BioRad, München) und lief nach folgendem Temperatur-Schema (Tabelle 13) ab:

| Zeit | Temperatur |
|----------------|--|
| 10 Min. | 25°C |
| 50 Min. | 48°C |
| 15 Min. | 70°C (Abstoppen der Reaktion durch Erhitzen) |
| 10 Min | 4°C |

Tabelle 13: Zeit-Temperatur-Schema Multicycler

Optional bei PCR-Zielen > 1kb konnte jetzt die RNA durch Zugabe von 1,4 µl RNase H-Mix (1:1 mit PCR-Wasser) nach kurzem Mischen und Abzentrifugieren im Multicycler bei 37°C für 20 Min. entfernt werden. Die gewonnene cDNA wurde entweder sofort in der PCR zur Vervielfältigung der cDNA weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

2.3.7 DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

In jeden Ansatz der Polymerase-Kettenreaktion wurde 2 µl der cDNA Präparationen eingesetzt. Wir verwendeten folgende Primer für unsere EMMPRIN-PCR (Tabelle 14):

| Bezeichnung | Art | Sequenz 5´ - 3´ | Referenz |
|--------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| EMMP 1S | sense Primer | ACT CCT CAC CTG CTC CTT GA | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland |
| EMMP 1AS | antisense Primer | GCG AGG AAC TCA CGA AGA AC | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland |

Tabelle 14: In der PCR verwendete Primer

Die Proben für die PCR wurden nach folgendem Schema pipettiert (Tabelle 15):

| | |
|---|--------------------|
| Primer | 2,5 µl (10pmol/µl) |
| cDNA | 2 µl |
| Nukleotid-Mix GoTaq® (Invitrogen, Karlsruhe) | 12,5 µl |
| A.d. | ad 25 µl |
| gesamt: | 25 µl |

Tabelle 15: Schema zur PCR

Die Reaktionen fanden im I-Cycler® (BioRad, München) statt. Nach einer initialen Denaturierung der cDNA für 3 Min. bei 94°C schloss sich das eigentliche

Amplifikationsprogramm an, welches aus folgenden Einzelschritten (Tabelle 16) bestand:

| Vorgang | Zeit | Temperatur |
|-------------------------|-------------|-------------------|
| Denaturierung | 30 sec. | 94°C |
| Primer-Annealing | 30 sec. | 60°C |
| Primer-Extension | 1 Min. | 72°C |

Tabelle 16: Amplifikationsprogramm PCR

Dieses Amplifikationsprogramm wurde in einem Zyklus von 35 Wiederholungen durchgeführt und es schloss sich die Auffüllreaktion der entstandenen DNA-Stränge für 5 Min. bei 72°C an.

2.4 siRNA-Technologie

2.4.1 Einführung

Mithilfe der RNA-Interferenz (=RNAi) kann in eukaryoten Zellen die Genexpression einzelner Gene spezifisch gehemmt werden. 1990 zufällig unter dem Oberbegriff Cosuppression bei der Züchtung von Petunien entdeckt (Jorgensen 1990; Napoli, Lemieux et al. 1990), bei welcher statt der gewünschten Verstärkung der Blütenfarbe eine blassere Blüte entstand, zeigte sich bald, dass die Gene nicht nur auf Ebene der Transkription ausgeschaltet werden, sondern dass auch die synthetisierte mRNA innerhalb der Zelle degradiert wird. Dieser Vorgang des posttranskriptionalen Gen-Silencings (PTGS) wurde 1998 in dem Fadenwurm *C.elegans* durch die Einbringung von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in die Zelle und daraus resultierendem Gen-Knockdown entdeckt (Fire, Xu et al. 1998). Hierfür wurde A. Fire und C. Mello 2006 der Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen. Kurze RNA-Stücke mit einer Länge von 25 Nukleotiden, welche als sogenannte small interfering RNA (siRNA) sehr effizient und spezifisch über Basenpaarung an die Ziel-RNA in der Zelle binden, wurden in virusinfizierten Pflanzen zum Gen-Silencing entwickelt (Hamilton and Baulcombe 1999). Diese Methode wurde optimiert durch Verwendung von 21 nt – langen RNAs (Elbashir, Lendeckel et al. 2001; Elbashir, Martinez et al. 2001), welche die eukaryote Zelle besser tolerierte als die langen dsRNAs. Durch Anlagerung der transfizierten siRNA an die komplementären RNA-Sequenzen werden diese Transkripte degradiert. Die Dauer des Silencing hängt einerseits von der Anzahl der Zellteilungen und andererseits von der Halbwertszeit der codierten Proteine (Dykxhoorn, Novina et al. 2003) ab. Ein weiteres Problem stellt immer noch das

Einbringen der siRNA in die Zelle dar. Da die kurze Überlebenszeit synthetischer RNAs transient ist, wurden Vektoren verwendet, durch welche die Produktion von siRNA innerhalb von Zellen stabil möglich ist.

siRNA, welche gezielt auf die Sequenz des humanen EMMPRIN/CD147 gerichtet ist, wurde schon von der Arbeitsgruppe um Chen in einer anderen Tumorentität beschrieben (Chen, Lin et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Methoden zum Silencing von EMMPRIN/CD147 mittels siRNA verwendet:

- direktes Einbringen der „small-interference-RNA (si-RNA)-Oligonukleotide“ durch Transfektion der Zellen mit den entsprechenden siRNA-Oligonukleotiden führt zu transientem Silencing
- stabile Inhibition der Genexpression mittels eines lentiviralen Vektors (Transduktion)
- An- und Ausschalten der Genexpression über das konditionale TetOn/Off-System

Es werden in allen drei angewandten Methoden dieselben siRNA-Oligonukleotid-Sequenzen verwendet (Sidhu, Nawroth et al. 2010).

2.4.2 Transiente Transfektion eukaryoter Zellen mit siRNA-Oligonukleotiden

Die Methode der spezifischen Expressionsreduktion mittels siRNA in Säugetierzellen wurde in der Arbeitsgruppe um T. Tuschl entwickelt (Elbashir, Lendeckel et al. 2001; Elbashir, Martinez et al. 2001). Die in dieser Arbeit verwendeten doppelsträngigen siRNA-Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Für die transiente Transfektion der Harnblasenkarzinomzellen mit den siRNA-Oligonukleotiden wurde der Transfektionskit *X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent*[®] der Firma Roche verwendet. Als Vorbereitung wurden an Tag 1 entsprechende Zellmengen (5×10^4 Zellen für BrdU-Uptake im Proliferations-Assay und anschließender FACS-Analyse, 3×10^5 für Scratch-Assay bzw. 10×10^4 für Detektion der Proteine im Westernblot) im 6-well Format ausgesät und 24h in RPMI-Medium so kultiviert, dass am Folgetag eine Konfluenz des Zellrasens von 50-80 % erreicht wurde. An Tag 2 wurde nach einem Medienwechsel mit 2 ml vorgewärmtem RPMI-Medium durch Zugabe des vorbereiteten siRNA-Komplexes die Transfektion initialisiert. Es wurden pro 6-well 2 µg siRNA-Oligonukleotid mit 10 µl XtremeGene Transfektionsreagenz auf 200 µl vorgewärmtes OptiMEM veranschlagt und nach

einer Inkubationszeit von 15-20 Min. bei RT wurde dieser siRNA-Komplex auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden unter den üblichen Kulturbedingungen im Brutschrank kultiviert. An den Tagen 3-5 wurden Zelllysate gewonnen (s. 2.6.1) bzw. die Zellen für die Weiterverwendung in den funktionellen Assays gesplittet.

2.4.3 Stabile Transduktion mit shRNA mittels Infektion der Zellen mit Lentivirus

Um in den Harnblasenkarzinomzelllinien ein stabiles EMMPRIN-Silencing auch in Tochtergenerationen der Zellkultur zu etablieren, wurde durch M. Wiznerowicz et al. eine Infektion der Zellen mit einem Lentivirus entwickelt¹³, welche eine Transduktion der EMMPRIN-Vektor-DNA in das Genom der Zelle nach sich zieht. Somit kann eine „short hairpin-RNA“ (shRNA) ins Genom der entsprechenden Zelle stabil integriert werden. Die für das EMMPRIN-Gen spezifische siRNA-Sequenz bildet mit dem reversen Komplementärstrang durch Faltung eine kurze Haarnadelstruktur-RNA, die durch das DICER-Enzym zur funktionstüchtigen siRNA prozessiert wird.

Lentiviren sind behüllte Einzelstrang-RNA-Viren und bilden eine Gattung innerhalb der Familie der Retroviren. In der hier verwendeten Form waren die Lentivirus-Partikel replikationsinkompetent (Wiznerowicz and Trono 2003). Über dieses lentivirale System inkorporieren die Zellen auch ein Reporter-Gen für „Green Fluorescent Protein“ (GFP), wodurch sich die transduzierten Zellen anfärben lassen. So kann GFP als Marker für die Genexpression und Tumordissemination in vivo verwendet werden (Chalfie, Tu et al. 1994). Die Infektiosität der Lentivirus-Partikel wurde durch die gleichzeitige Expression von GFP nachgewiesen. Die shRNA wurde gemäß den Vorgaben von Trono et al. entwickelt.¹⁴

Für das lentivirale Vektorsystem wurden folgende Plasmide¹⁵ eingesetzt: pLVTHM, psPAX2, pRSV Rev und pMD2.G. Die verwendeten Plasmide sind im Anhang unter Plasmidkarten abgebildet.

Zur Vorbereitung wurden gewünschter Transfer-Vektor (20 µg pLVTHM bzw. pLVTHMEMMPsh2), für Verpackungs-Proteine des Virus kodierende Plasmide (15 µg psPAX2 und 5 µg pRSV-Rev) und das Plasmid, welches für die Virushülle kodiert (6 µg pMD2.G) in einem sterilen Eppendorf-Gefäß mit A.d. zu 0,5 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und mit 0,5 ml 2 x HBS vermischt. Dieser Vorgang der Calcium-Phosphat

¹³ Vgl. Protokolle und Anleitung unter: <http://lentiweb.com/> vom 13.11.2008 bzw. <http://tronolab.epfl.ch/page58115.html> vom 03.12.2009.

¹⁴ Vgl.: http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html vom 03.12.2009.

¹⁵ Vgl.: http://www.addgene.org/Didier_Trono vom 12.12.2011.

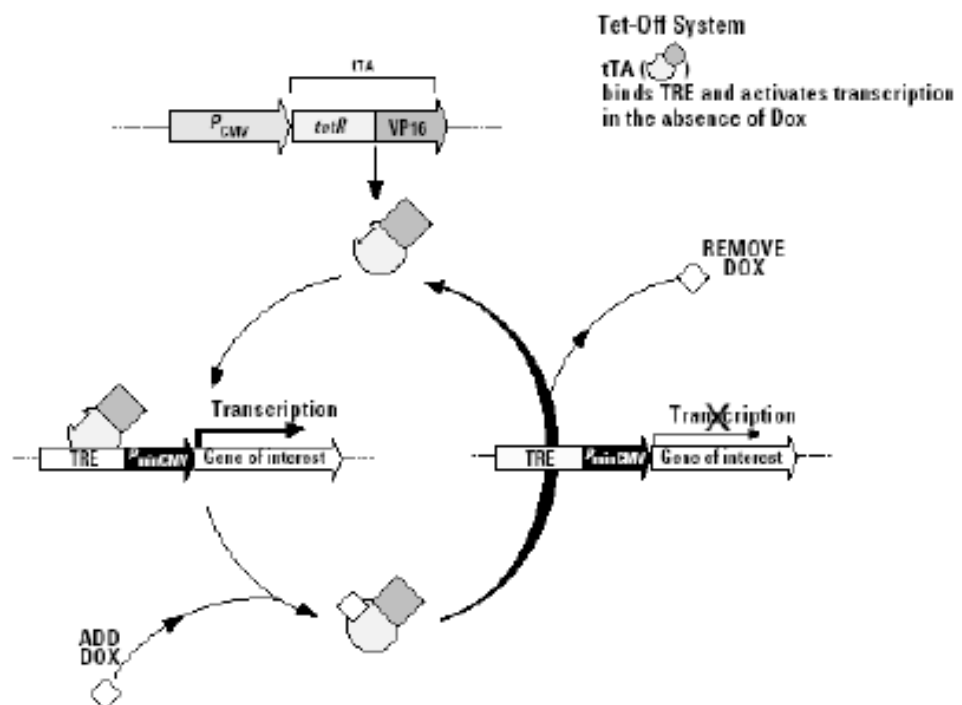
Präzipitation wurde mit 50 μ l 2,5 M CaCl_2 während einer Inkubationszeit von 20 – 25 min bei RT gestartet. In der Nierenzelllinie 293T ließ sich das Lentivirus synthetisieren. Am vierten Tag nach Transfektion der 293T-Zellen wurde der Überstand aus den 10 cm Schalen gesammelt, bei 3000 RPM für 5 min bei RT abzentrifugiert und 2 x steril durch 0,45 μ m - Filter gepresst. Pro 1 ml filtriertem Virusüberstand wurden 10 μ l Polybrene zugegeben, welches die Oberflächenspannung zwischen Virus und Zelle herabsetzt. So vorbereitet konnte der Virusüberstand bei 4 °C über ca. 2 Wochen aufbewahrt werden und bei Bedarf auf die entsprechenden Harnblasenkarzinomzellen zur stabilen shRNA-Transduktion appliziert werden. Hierfür wurden für ein 6er-Well 2 ml des bei 37 °C im Wasserbad erwärmten Virusüberstands auf die Zellen pipettiert und die stabile Transduktion mit dem Vektor für sh-RNA zum EMMPRIN-Silencing in den Harnblasenkarzinomzellen initialisiert.

2.4.4 Stabile Transfektion mit siRNA und ON/OFF-Modulation der Plasmide durch das pTETON-System

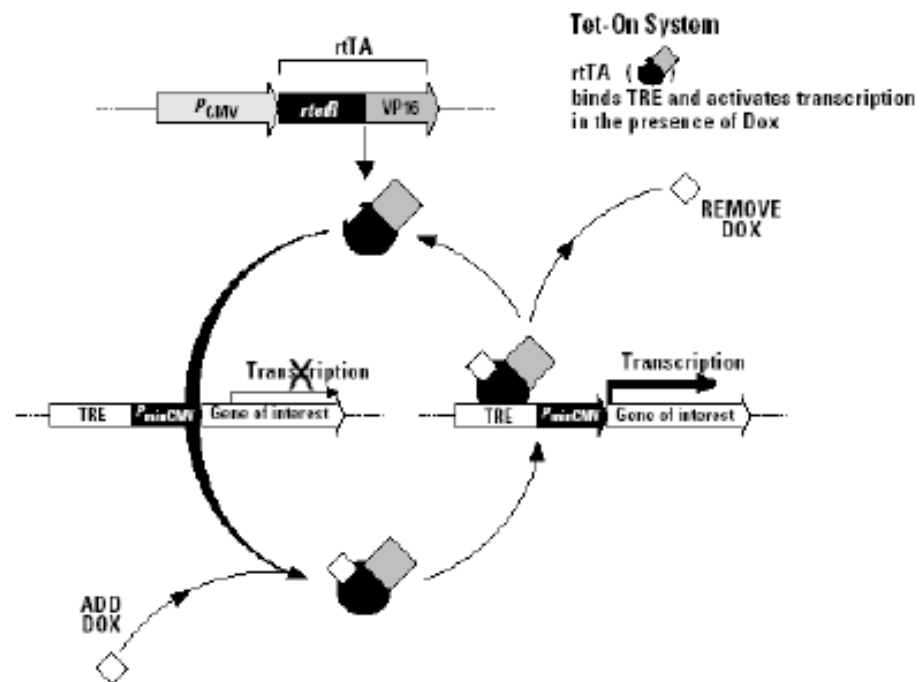
Mit dem Tet-System stand uns eine weitere Möglichkeit einer stabilen Einflussnahme auf die spezifische Genexpression zur Verfügung. Dieses von Gossen und Bujard 1992 beschriebene System stellt ein wirksames Instrument zur artifiziellen Regulation von Transgenen dar (Gossen, Bonin et al. 1993; Gossen and Bujard 1995). Das System besteht aus einer regulierenden („Regulator“) und einer regulierten („Response“) Einheit, die sich auf zwei separaten Plasmiden befinden. Die regulierende Tet-Off-Einheit exprimiert den tet-responsiven transkriptionellen Aktivator (tTA), ein Fusionsprotein aus bakteriellen und viralen Bestandteilen. Dieser besteht aus Kontrollelementen des Tet-Repressors (TetR) im Tetracyclinresistenz-Operon von *E. coli* und der C-terminalen Aktivierungsdomäne des VP 16-Proteins des Herpes-simplex-Virus (HSV). Die regulierte Einheit besteht aus dem Tet-responsiven Element (TRE) (Masters, Hepburn et al.), das sich aus sieben Kopien der Tet-operator DNA-Sequenz (*tetO*) des Tetracyclinresistenz-Operons von *E. coli* und einem minimalen, d. h. nicht aktiven CMV-Promotor zusammensetzt. Nur in Abwesenheit von Tetracyclin oder Doxycyclin kann tTA an das TRE binden und die Transkription aktivieren. Die Tet-On-Einheit entsteht durch vier Punktmutationen im *TetR*-Gen, die zur Expression eines reversen tet-responsiven transkriptionellen Aktivators (rtTA) führen, der bezüglich Bindung an das TRE und Aktivierung der Expression genau die umgekehrte Funktionsweise besitzt. D. h. nur in Anwesenheit von Tetrazyklin bindet der Tet-Aktivator, das Genprodukt von *rtTA*, jeweils als

Homodimer mit großer Affinität an jede der beiden Tet Operator Sequenzen im H1 Promotor des pENTR / H1 / TO Entry-Vektors (Hillen and Berens 1994). In dieser Konfiguration werden die in den Entry-Vektor klonierten Gene exprimiert. Nach Zugabe von Tetrazyklin zum Medium bindet Tetrazyklin hochaffin an den Tet-Repressor in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1; diese Bindung verändert die Konformation des Tet-Repressors, so dass er von den Operator-Sequenzen abdissoziiert und die Transkription der Genabschnitte nach dem H1-Promotor stattfinden kann. Wird Tetrazyklin entfernt, kann der Tet-Repressor wieder an die Operator-Sequenzen binden und die Expression nachfolgender Genabschnitte somit erneut „abschalten“. Dabei ist das Tet-On-System ausschließlich empfindlich für Doxycyclin, das Tet-Off-System für Tetracyclin, Doxycyclin und einige andere Derivate mit unterschiedlicher Pharmakodynamik. In der vorliegenden Arbeit wurde für alle Versuche das TetON-System und damit auch ausschließlich Doxycyclin verwendet. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die dosisabhängige Expressionshemmung oder –aktivierung, die für beide Systeme beschrieben wurde. Von Gossen und Bujard wurde eine dosisabhängige Regulation der Expression im Bereich 0,001-1 µg Doxycyclin pro ml Kulturmedium nachgewiesen (Gossen and Bujard 1992). Eine Aktivierung dieses Systems ist also mit einer Dosierung erreichbar, bei der keine Nebenwirkungen im Organismus zu erwarten sind. Eine graphische Darstellung beider Systeme zeigen die Abbildungen 7 a) und und b):

Tet-Off



Tet-On



Abbildungen 7 a) und b): Das Tet-System. Dargestellt sind Tet-On/Off-Einheit und Tet-responsives Element¹⁶.

Der Vorteil dieser Methode ist die Induzierbarkeit des Systems. Somit lässt sich eine Genexpression wie mit einem Schalter an- und ausschalten.

2.4.4.1 Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA

Zur Transfektion der Harnblasenkarzinomzelllinien mit den verschiedenen DNA-Plasmiden wurde als Transfektionsreagenz FuGENE® der Firma Promega verwendet. Die angegebenen Mengen und Konzentrationen beziehen sich auf je eine Einheit im 24-well-Format. Um den systematischen Fehler durch ungenaue Pipettierung möglichst gering zu halten, wurden nur Mengen > 1 µl pipettiert und kleinere Mengen entsprechend in größerem Maßstab verarbeitet bzw. vorverdünnt. Gesamtvolumen des Komplexes aus Plasmid-DNA, FuGENE®-Transfektionsreagenz und OptiMEM® (MinimumEssentialMedia, Invitrogen Karlsruhe) sollte 20 µl sein. In einem sterilen RNase-freien 1,5ml-Reaktionsgefäß wurden zum vorgewärmten OptiMEM® vorsichtig bei möglichst geringem Plastikkontakt 0,6 µl FuGENE® pipettiert und für 10 min bei RT inkubiert. 0,3 µg der aufgereinigten Plasmid-DNA wurden in einem eigenen Reaktionsgefäß 5 min bei 65°C vorbereitet. Die DNA wurde auf die FuGENE®-OptiMEM®-Mischung pipettiert

¹⁶ aus: CLONTECH Product Catalog – Tet-On and Tet-Off Gene Expression Systems, http://www.clontech.com/products/catalog01/Sec4/p126_128tetontetoff.shtml vom 16.09.2009.

und das Ganze für 20-30 min bei RT inkubiert, sodass sich ein Lipid-DNA-Komplex bilden konnte. Das Medium wurde von den zur Transfektion vorgesehenen Kulturzellen abgenommen, sie wurden zweimal mit PBS gespült und mit 2 ml temperiertem Kulturmedium überschichtet. Dann wurde die vorbereitete FuGENE®/DNA-Mischung tropfenweise auf die Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schwenken verteilt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Transfektionsansatz für 24 h bei 37°C, 98% Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. Das FuGENE®/DNA/Medium-Gemisch wurde nach 24 h abgenommen und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Dieses enthielt Antibiotika für die Selektion von Zellen, welche die transfizierte DNA in ihr Genom integriert haben.

Es wurden folgende Konzentrationen der Antibiotika in den Selektionsmedien verwendet:

| | |
|------------|-----------|
| Geneticin | 0,8 mg/mL |
| Zeocin | 400 µg/mL |
| Hygromycin | 400 µg/mL |

Ein Medienwechsel wurde im 48h-Zyklus vorgenommen. Die Selektion der Zellen im Selektionsmedium und das Absterben der Zellen ohne das entsprechende Resistenzgen gegen die Antibiotika wurden im Lichtmikroskop beobachtet und dokumentiert.

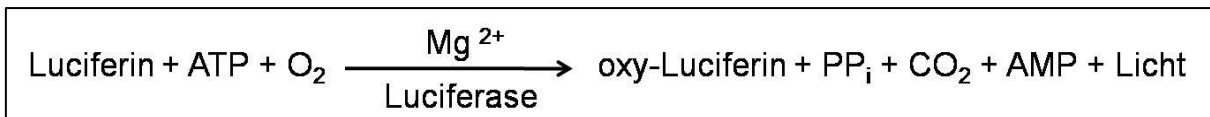
2.4.4.2 Picken der Einzelklone & Luciferase-Tests

Zur Etablierung von Einzelklonen, welche nach erfolgter Transfektion durch das Resistenzgen selektioniert genau die vorgegebenen DNA-Plasmide enthalten sollten, vereinzeln wir die ausgewählten Klone durch Splitten von 200 abgezählten Zellen auf fünf 96-well-Platten oder durch Ablösen von einzelnen Zellklonen mithilfe von Klonierungsringen (*cloning rings*). Bei erstgenannter Methode werden 200 Einzelklone in insgesamt 5 x 96 = 480 well kultiviert um sicherzustellen, dass keine Mischkultur vorliegt. Für die zweite Methode der Vereinzelung von Zellklonen wurden einzeln stehende Zellpopulationen in einer 10cm-Zellkulturschale isoliert weiterkultiviert. Die Klonierungsringe wurden mit steriler Vaseline abdichtend um einen Zellklon in der Zellkulturschale aufgesetzt, der Klon mit Trypsin abgelöst und dann, vorsichtig in eine neue 24-well-Platte überführt, mit dem Selektionsmedium weitergezüchtet.

Zur Austestung der pTETON-Aktivität wurden die Zellklone transient mit den Plasmiden pTRES HygLuc für die Firefly-Luciferase und dem Plasmid für die Renilla-

Luciferase nach dem bisher etablierten Protokoll (s. 2.4.4.1) im 24-well-Format transfiziert. Renilla-Luciferase ist ein Enzym, das aus der zur Biolumineszenz fähigen Korallenart *Renilla reniformis* rein erhalten wird. Das Enzym katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Coelenterazin in Anwesenheit von Sauerstoff, um blaues Licht mit einem Emissionswellenlängen-Maximum von 478 nm zu erzeugen.¹⁷ 24 h nach Transfektion mit den Plasmiden wurde das pTETON-System durch Zugabe von Doxycyclin in der Konzentration von 1-4 µg/10 µl zur Aktivität induziert und dieser Effekt in einem Luciferase-Assay getestet. Hierbei wurde sowohl die Aktivität der Firefly- als auch die der Renilla-Luciferase nach Zugabe der Assay-Reagenzien im Multiplate-Photometer gemessen.

Dieser Chemielumineszenz-Assay dient der quantitativen Bestimmung der Luciferase- und damit der Promotor-Aktivität in transfizierten Zellen. Die folgende Formel 3 erklärt den hierbei chemisch ablaufenden Prozess:



Formel 3: Chemilumineszenz im Luciferase-Assay

Es wurde das Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System der Firma Promega mit dem entsprechenden Protokoll verwendet. Das absolut gemessene Biolumineszenz-Signal wurde nach Abzug des Blind-Wertes im Vergleich aktives bzw. inaktives pTETON statistisch ausgewertet.

2.4.4.3 Aktivierung des pTETON-Systems durch Stimulation mit Doxycyclin

Wie schon erwähnt (s. 2.4.4) steuert das pTETON-Plasmid durch Zugabe von Doxycyclin in das Kulturmedium in den Konzentrationen 1-4 µg / 10 µl die Regulation des entsprechenden Promotors. Wird die Zellkultur, welche nun stabil mit dem Plasmid pTETON und dem entsprechenden Zielplasmid pTREHygHEMMP (EMMRPIN-Überexpression), pTREHygLuc (Austesten der Transfektionseffektivität im Luciferase-Assay) oder pENTR-shRNA (spezifische Inhibition der EMMPRIN-Expression) transfiziert ist, mit Doxycyclin über mindestens 24 h stimuliert, dann wird über den Transkriptionsinitiationskomplex die Expression der entsprechenden shRNA induziert (Abbildungen 7 a) und b). So kann gezielt die Expression eines Gens wie z.B. für EMMPRIN induziert oder inhibiert werden. Unterbleibt die Stimulation, so wird der pTETON-Vektor nicht aktiv abgelesen und eine shRNA-

¹⁷ Vgl. <http://www.patent-de.com/20041014/DE69726306T2.html> vom 09.08.2010.

Expression wird nicht induziert. Wichtig war, dass weiterhin das Kulturmedium und auch das mit Kulturmedium verdünnte Doxycyclin die entsprechenden Antibiotika für das neu eingebaute Resistenzgen in den Zellen enthielten.

2.5 Funktionelle Assays

2.5.1 Herstellung stabiler Zelllinien

Die mit EMMPsi-Oligonukleotiden transfizierten (2.4.2), die über die Lentivirusinfektion mit dem Plasmid pLVTHEMMPsh (2.4.3) ausgestatteten bzw. die mit dem induzierbaren pTETON-Vektor und dem dazugehörigen shRNA-Vektor transfizierten Zellen (2.4.4), in welchen nun gezielt das Gen für die Expression von EMMPRIN ausgeschaltet war bzw. werden konnte, wurden unter optimalen Kulturbedingungen bei 37 °C unter wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ weiterkultiviert und nach 24 h ein erster Medienwechsel vorgenommen. Im Zeitraum der nächsten fünf Tage (an entsprechenden Stellen mit d0-d5 abgekürzt), an welchen die EMMPRIN-Expression in den Zellen unterschiedlich stark unterdrückt war, wurden dann jeweils nachfolgend beschriebene funktionelle Assays angesetzt. Alle funktionellen Untersuchungen wurden dreifach wiederholt.

2.5.2 Migration der Zellen im Scratch-Assay

Um die Migrationsfähigkeit der Zellen mit einer reduzierten EMMPRIN-Expression im Vergleich zur si-Kontrolle zu analysieren, wurde in Anlehnung an ein 2007 publiziertes Protokoll von Liang et al. ein Scratch-Assay durchgeführt (Liang, Park et al. 2007).

Zur Vorbereitung wurden die schon im Vorfeld mit si-RNA transfizierten Blasenkarzinomzelllinien enzymatisch mittels Trypsin/EDTA-Lösung (0.05 % in PBS; 5 min; 37 °C) gelöst, zentrifugiert und das Zellpellet resuspendiert. Nach Auszählung der Zellzahlen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurden je 3×10^5 Zellen auf ein Well einer 6-Well-Platte in vorgelegtem Nährmedium gleichmäßig ausgesät und unter den üblichen Kulturbedingungen (s. 2.2.3) kultiviert. Bei Erreichen von Konfluenz nach ca. 24 h wurde der Zellmonolayer vorsichtig mit einem Pipettenspitzen-Kratzer („*Scratch*“) versehen. Hierbei war darauf zu achten, dass von Hand mit einer sterilen 1000er Pipettenspitze (Eppendorf) eine möglichst gerade und gleichmäßig breite (ca. 800 µm) Furche durch den dichten Zellteppich gezogen wurde. Die dabei abgelösten Zellen wurden abgesaugt, ein Medienwechsel vorgenommen und die Zellkultur weiterhin unter den üblichen Bedingungen inkubiert. Die Besiedlung der verletzten Fläche und das Migrieren der Invasionsfront wurde bis zum vollständigen Scratch-

Schluss im 6 h Intervall photographisch mit einer Canon EOS 10D Digitalkamera dokumentiert. Um eine Vergleichbarkeit der Photos zu gewährleisten und den Verlauf des Scratch-Schlusses an identischer Stelle zu dokumentieren, wurde der durchsichtige Wellboden von unten markiert und immer dasselbe Gesichtsfeld im Mikroskop eingestellt und photographiert. Für die Auswertung der Messung wurde die relative Migrationsfähigkeit prozentual im Vergleich zu den Kontrollzellen bestimmt. Die Auswertung und Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Adobe® Photoshop® und Microsoft® Office Excel.

2.5.3 Proliferation-Assays

2.5.3.1 XTT-Assay

Bei dem hier verwendeten XTT-Test handelt es sich um einen Assay zur Bestimmung von Zellproliferation und -vitalität über die Messung der Metabolisierungsrate. Das Prinzip des Tests beruht auf der Metabolisierung des gelben Tetrazoliumsalses XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid, SIGMA Saint Louis Missouri USA) in den orangefarbenen Formazan-Farbstoff durch mitochondriale Dehydrogenasen stoffwechselaktiver Zellen unter Anwesenheit des elektronenbindenden Agens PMS (Phenazin Methosulfat, SIGMA Saint Louis Missouri USA). Proliferierende Zellen haben eine gesteigerte Aktivität dieser mitochondrialer Dehydrogenasen und setzen mehr XTT um. Der Farbstoff ist wasserlöslich und kann quantitativ im ELISA-Reader im Sinne einer Extinktionsveränderung bestimmt werden. Die Menge an gebildetem Farbstoff ist direkt proportional zu der Anzahl vitaler Zellen.

Die zu untersuchenden Zellen wurden am Vortag nach Trypsinierung in einer Dichte von 1×10^4 Zellen / Well in eine 96-Well-Kulturplatte ausgesät und wuchsen in 200 μ l Standardmedium über 24 h. Aufgrund der Lichtsensibilität wurden die XTT-Reagenzien unmittelbar vor Anwendung des Testes bei 37 °C im Dunkeln aufgetaut und zu 5 ml XTT Reagenz wurden 100 μ l des „electron-coupling“ Reagenz PMS dazugegeben. Unter abgedunkelten Bedingungen in der Sterilbank wurden von dieser Mischung 50 μ l in jede Probe gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3 h bei 37 °C im dunklen Brutschrank wurde die Extinktion im ELISA-Plattenreader bei Wellenlängen von 450 nm und 650 nm gemessen. Dabei war bei 450 nm das optimale Absorptionsspektrum für XTT gegeben und die Messung der Absorption bei 650 nm (Referenzwellenlänge) diente zum Abzug des Backgrounds, der von Zellbruchstücken, Fingerabdrücken oder anderen Störfaktoren herrührt. Die

Absorption eines Blindwertes (Substrat auf Medium ohne Zellen) wurde von den Messwerten abgezogen. Für eine höhere Aussagekraft des Tests wurden meist 4- oder 8-fach Proben verwendet und dementsprechend die Mittelwerte der Extinktionen berechnet

2.5.3.2 BrdU-Inkorporation

Mit dieser Methode wird der Anteil der Zellen einer Zellkultur bestimmt, der sich in der DNA-Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus befindet. Die Zellen werden in Kultur mit Bromodeoxyuridin (BrdU) versetzt, welches bei DNA-Neusynthese in der S-Phase des Zellzyklus anstelle der Pyrimidinbase Thymidin in die DNA eingebaut wird. Ein Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper bindet an das BrdU. Danach werden alle Zellen mit dem orange-roten Farbstoff 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) angefärbt, um die DNA-Menge der Gesamtpopulation zu bestimmen (Wadkins and Jovin 1991). Beide Signale werden im FACScan Durchflußzytometer gemessen.

Die Zellen wurden in einem aufwendigen BrdU-Markierung, Färbungs- und Fixierungsverfahren für die FACS-Messungen folgendermaßen vorbereitet:

benötigte Puffer: 1 x Dulbeccos PBS

10 x BD Perm/Wash Buffer: 1:10 verdünnt in A.d.

1 x BD Cytoperm Plus Buffer

1 x BD Cytofix/Cytoperm Buffer

Staining Buffer: 1 x Dulbeccos PBS

3 % v/v FCS

0,04 % v/v Natrium Azid

Konfluente Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen / Well in 6-Well-Kulturschalen ausgesät. Mit diesem Erfahrungswert konnte für den Tag der BrdU-Inkorporation eine Konfluenz der Zellen von ca. 80 % sichergestellt werden. Nach 24 h erfolgte die siRNA-Transfektion (siehe 2.4.2 bzw. 2.4.3). An den darauffolgenden Tagen wurden zum Zeitpunkt der (empirisch ermittelten) effektivsten Hemmung der EMMPRIN-Expression die Zellen über 1 h unter den üblichen Kulturbedingungen mit 32,5 mM BrdU markiert: Es wurde das *APC BrdU Low Kit* der Firma BD Pharmingen gemäß dem BD Pharmingen™ BrdU Flow Kit Staining Protokoll verwendet. Der BrdU-Stock (10 mg/ml) wurde 1:32 und 1:100 in vorgewärmtem Medium verdünnt und auf die Zellkultur pipettiert. Parallel dazu wurden jeweils Zellen weitergezogen und für die FACS-Messungen vorbereitet, die nicht mit BrdU gelabelt wurden, um passende negativ-Kontrollen zu generieren.

Die Zellen wurden mit Trypsin geerntet, zentrifugiert (immer bei 250 g, 5 min) und der Überstand abgesaugt. Daraufhin wurde das Pellet mit 1 ml PBS gewaschen, erneut zentrifugiert, abgesaugt und die Zellen mit 100 µl BP Cytofix/Cytoperm Buffer für 15 – 30 min bei RT fixiert und permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschrift (ab hier immer mit 1 ml BD Perm/Wash Buffer) und der anschließenden Zentrifugation wurde das Zellpellet über Nacht (oder länger) in 1 ml Staining Buffer bei 4 °C gelöst. Zwischen allen nun folgenden Schritten wurden jeweils die Zellen zuerst zentrifugiert und dann der Überstand vom Pellet vorsichtig abgesaugt. Man resuspendierte die Zellen in 100 µl BD Cytoperm Plus Buffer und ließ sie über 10 min auf Eis stehen, um nach einem weiteren Waschschrift und der anschließenden Zentrifugation das Zellpellet wieder in 100 µl Cytofix/Cytoperm Buffer für 5 min bei RT zu resuspendieren. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 100 µl verdünnter DNase resuspendiert und 1h bei 37°C inkubiert. Wieder wurden die Zellen gewaschen und dann mit 1:100 verdünntem fluorescent anti-BrdU inkubiert. Da das Fluorochrom Allophycocyanin (APC) lichtsensitiv ist, mussten alle folgenden Schritte lichtgeschützt durchgeführt werden. Nicht gebundene Antikörper wurden abgewaschen und das Zellpellet nach weiterer Zentrifugation kurz vor den FACS-Messungen mit 20 µl 7-AAD gefärbt. Auch hier wurden jeweils Proben mit und ohne 7-AAD als Kontrollen generiert. In 500 µl Staining Buffer gelöst, in FACS-Röhrchen überführt und lichtgeschützt zum FACS-Gerät transportiert, wurden die Proben sofort im FACS-Scan gemessen.

2.5.4 FACS-Analyse

Transfizierte Zellen wurden mit Hilfe eines FacScan™ und eines FacStar™ der Firma Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA) analysiert. Die FACS-Analyse gehört zu den Methoden der Durchflusszytometrie (flow cytometry) und ist eine Technik, um mikroskopisch kleine Partikel, die in einer Flüssigkeit gelöst sind, zu zählen, zu untersuchen oder zu sortieren. Hierbei werden die in einer Lösung befindlichen Zellen in eine laminare Strömung versetzt, durch eine Kapillare mit ca. 70 µm Durchmesser gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Argon-Laserstrahl. Die Zellen emittieren dabei Streulicht und, wenn Antikörper gebunden sind, Fluoreszenz-Impulse, woraus man unterschiedliche Eigenschaften der Zelle und diverse Zellfraktionen ableiten kann.

Hierzu dienen zwei Parameter: Das Vorwärtsstreulicht (sog. Forward Scatter = FSC) als Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und damit als Maß für die

Zellgröße. Und das Seitwärtsstreulicht (sog. Sidewards Scatter = SSC) als ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Zudem kann man die Probe vorher mit Antikörpern, die mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen verbunden sind, inkubieren. Nach Markierung kann dann auch die Sortierung nach diesen Merkmalen erfolgen. Durch Einsatz verschiedenfarbiger Laser kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden. Das FACS stellt ein hochsensibles Messgerät dar, mit dem auch geringe Fluoreszenzunterschiede zuverlässig erfasst werden können.

Als Grundeinstellung wählten wir eine Analyse von jeweils 10.000 vom FACS detektierten Fluoreszenz-Ereignisse bei einer Zähl-Geschwindigkeit von max. 1000/s. Die Spannung an den Achsen wurde jeweils so eingestellt, dass sich klare Populationen im Histogramm aufzeichneten. Die Messungen wurden mit den folgenden Achseneinstellungen vorgenommen:

FSC-H = Zellgröße

SSC-H = Zellgranularität

FL1-H = GFP (Green Fluorescent Protein)

FL3-H = 7-AAD (Aminoactinomycin D)

FL4-H = APC-konjugiertes BrdU (Allophycocyanin-Bromodesoxyuridin)

In Abbildung 8 sind im Histogramm die Zellpopulationen in den verschiedenen FACS-Kanälen FL3-H und FL4-H dargestellt. Exemplarisch wird hier eine FACS-Messung der Harnblasenkarzinomzelllinie RT112 abgebildet, welche nach der o.a. Methode analysiert wurde:

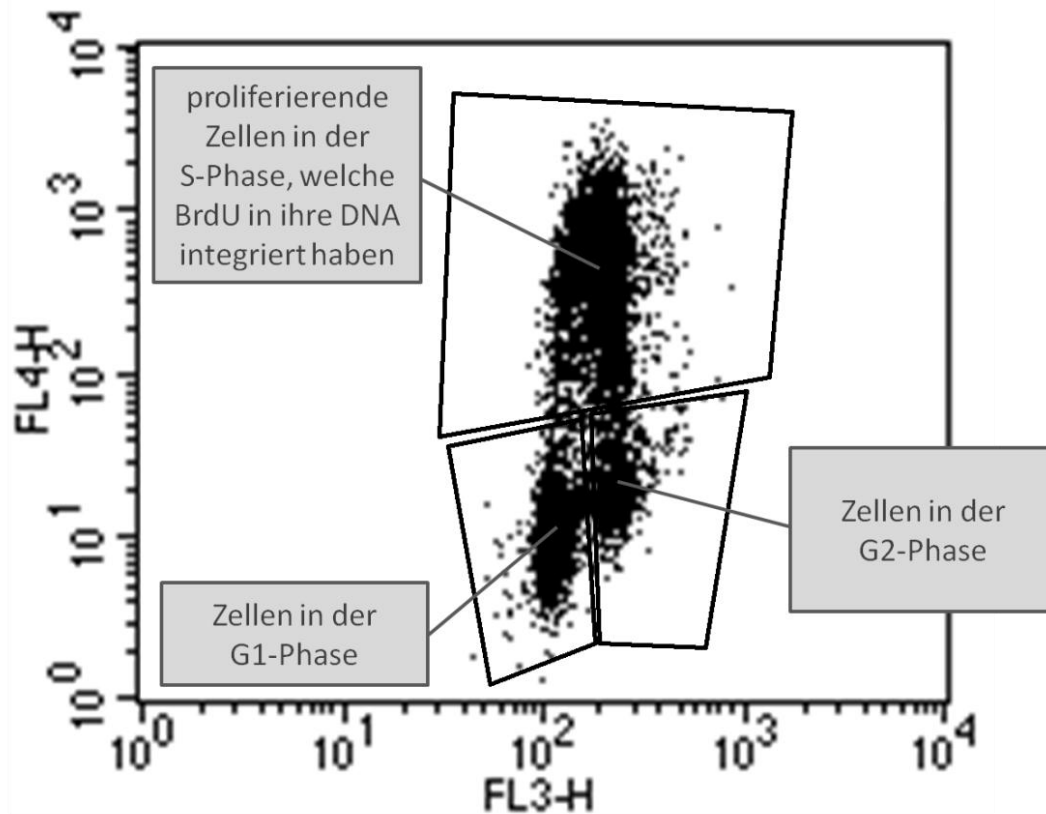


Abbildung 8: FACS-Messung von RT112 hinsichtlich Färbung mit 7AAD (x-Achse = FL3-H) und Analyse von APC-konjugiertem BrdU, welches von den proliferierenden Zellen in die DNA integriert wird (y-Achse = FL4-H).

Von Abbildung ausgehend wurden nun jeweils in der FACS-Auswertung die Zellpopulationen der vitalen proliferierenden Zellen in der S-Phase verglichen. Dies wurde mit Harnblasenkarzinomzelllinien durchgeführt, in welchen zuvor durch siRNA-Technologie ein moduliertes EMMPRIN-Expressionsniveau induziert wurde. Die Achseneinstellung der FACS-Analyse wurde je nach Untersuchung angepasst. So konnten auch unterschiedliche Färbungen der Zellen oder der Gehalt von z.B. Green Fluorescent Protein (GFP) der Zellen analysiert und graphisch in entsprechenden Diagrammen dargestellt werden.

Für die Analysen wurden immer Triplets der einzelnen Proben verwendet. Zur Analyse, Auswertung und graphischen Darstellung der FACS-Daten wurde das Acquisitionsprogramm CellQuest™ der Fa. Becton Dickinson (CellQuest™, Version 3.3, 2001) verwendet.

2.5.5 Apoptose-Assay (Messung der Aktivität von Caspase 3 / 7)

Unter Apoptose versteht man den genetisch gesteuerten Tod einer Zelle, welcher entweder unter normalen physiologischen Bedingungen als Teil des zelleigenen Stoffwechsels oder als Reaktion auf äußere Einflüsse eingeleitet wird. Bei intakter

Zellmembran wird innerhalb der apoptotischen Zelle u.a. eine Caspasen-Kaskade in Gang gesetzt. Diese Caspasen (**cysteiny**l **aspartate-specific protease**) aktivieren als sog. Initiator-Caspasen einerseits sekundäre Zielproteine, andererseits sind sie als sog. Effektor-Caspasen direkt am Abbau von Zellstrukturen beteiligt (u.a. Caspase 3, 6 und 7). Im hier verwendeten Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega, Mannheim) wird ein Lumineszenzsignal gemessen, das proportional zur Menge aktivierter Caspasen 3 und 7 in einer apoptotischen Zellkultur ist. Zwei enzymatische Schritte laufen bei diesem Nachweis unmittelbar hintereinander ab: Das Caspase-Glo® 3/7 Reagenz enthält ein Substrat für die Caspasen 3 und 7 (Z-DEVD-Aminoluziferin), das gespalten wird und dabei Aminoluziferin freisetzt. Das Aminoluziferin dient seinerseits wiederum als Substrat für eine weitere Luziferase, welche eine Luziferasereaktion mit verlängerter Halbwertszeit katalysiert.

Am Vortag wurden 2×10^4 Zellen pro Well in eine 96-well-Platte gesplittet und über 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. 75 µl des Caspase-Glo® 3/7 Reagenz wurden direkt, ohne vorherige Waschschrte, auf die Zellen gegeben. Nach etwa 10 min wurden die Proben und die vorbereiteten Negativkontrollen wegen der Lichtsensibilität in eine schwarze Mikrotiter-Platte umpipettiert. Nach 1 h Inkubation bei RT im Dunkeln stellte sich ein für mehrere Stunden stabiles Signal ein, das im Luminometer gemessen wurde. Auch hier wurden Mehrfach-Proben verwendet und die Auswertung erfolgte mit Microsoft® Office Excel.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

Für einen Großteil der Versuche wurden Proteinextrakte aus Zellkulturen im 6-well bzw. 24-well Format gewonnen. Deshalb beziehen sich die verwendeten Mengen und Arbeitsschritte immer auf ein 6-well [bzw. in eckigen Klammern auf ein 24-well]. Alle Arbeiten wurden soweit als möglich auf Eis durchgeführt.

2.6.1 Herstellung von Zelllysaten

Es wurde folgender **Lysepuffer** für die Ganzzelleextraktion gewählt:

| | |
|--------------|-----------------|
| 150 mM | NaCl |
| 50 mM | Tris/HCl pH 7,2 |
| 1 % (v/v) | Triton |
| 0,05 % (v/v) | SDS |
| 5 mM | EDTA |
| 90 % (v/v) | A.d. steril |

Proteaseinhibitoren (1000x):

| | |
|----------|--|
| 1 M | Phenylmethanolsulfonyl Fluorid (PMSF) (Roche, Mannheim); in DMSO gelöst |
| 10 µg/ml | Aprotinin (Roche, Mannheim); in A.d. steril gelöst |
| 10 µg/ml | Leupeptin (Roche, Mannheim); in A.d. steril gelöst |
| 2 µg/ml | Pepstatin (Roche, Mannheim); in Methanol gelöst |

Sämtliche Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen des Zellrasens mit PBS wurden auf den Zellrasen im 6-well Format 100 µl [50 µl] des frisch mit Proteaseinhibitoren (je 10 µl auf 10 ml Lysepuffer) versetzten Lysepuffers pipettiert. Die Zellen wurden dann mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst und in Lysepuffer suspendiert in ein verschließbares Eppendorf-Gefäß überführt. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (20.000 g, 30 min, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde abgehoben, sein Proteingehalt bestimmt (s. 2.6.2) und als Zelllysat weiterverwendet, das Zellpellet verworfen. Die Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.6.2 Proteinbestimmung im BCA-Test

Zur Bestimmung des Proteingehalts der einzelnen Proben wurde der Pierce® BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific benutzt. Die bei der Proteinbestimmung nach Lowry und Smith stattfindende Biuretreaktion beruht auf der Bildung eines Komplexes zwischen den Peptidbindungen im Protein und den Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung (Lowry, Rosebrough et al. 1951). Cu^{2+} wird in einem zweiten Schritt zu Cu^{1+} reduziert und mittels Bicinchoninsäure (BCA) in einen intensiv-rosa Komplex umgewandelt, welcher photometrisch gemessen wird (Smith, Krohn et al. 1985).

In dieser Arbeit wurden von jeder zu messenden Probe 3 µl mit 27 µl nativem Lysepuffer (ohne Proteaseinhibitoren) verdünnt und kurz im *Vortex Minishaker* gemischt. Davon wurden zweimal je 12,5 µl der im Verhältnis 1:10 verdünnten Proben in eine schwarze 96-well Mikrotiterplatte vorgegeben und mit 100 µl Workingreagenz versetzt. Mit Parafilm abgedeckt wurde die Proben 1min. auf dem Rüttelinkubator gut durchmischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Als Leerwert diente ein Ansatz, welcher nur 12,5 µl nativen Lysepuffer plus 100 µl Workingreagenz enthielt. Für die Eichkurve wurde eine BCA-Proteinstandard-Stammlösung (1 mg/ml in 0,1 N NaOH) verwendet. Entsprechende Volumina der

Stammlösung wurden mit 100 µl Workingreagenz versetzt. Die Proben der Eichkurve waren auf Protein-Konzentrationen zwischen 25 und 2000 µg/ml eingestellt. Die Auswertung erfolgte durch Messung der Extinktion bei 562 nm gegen den Leerwert im ELISA-Reader (Titerplattenphotometer). Die Messung wurde nach weiterer Inkubationszeit von ca. 2 h bei RT wiederholt.

2.6.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte mittels der denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Gemäß den im BCA-Proteintest errechneten Proteinkonzentrationen wurden 10-40 µg Protein mit nativem Lysepuffer auf je 30 µl Gesamtprobenvolumen verdünnt. Die zu untersuchenden Proteinproben wurden zusammen mit 10 µl eines Gelladepuffer (4x Gelladepuffer: 0,25 M Tris/HCl pH 6,8; 8 % (w/v) SDS; 40 % (v/v) Glycerin; 0,04 % (w/v) Bromphenolblau und jeweils *frisch* 1 M DTT) für 5 min bei 95°C erhitzt, um die Proteine durch Unterbrechung der Wasserstoffbrückenbindungen bzw. durch Reduktion der Disulfidbrücken mittels DTT in ihren Sekundär- und Tertiärstrukturen vollständig zu denaturieren.

Für die Gelelektrophorese wurde das Mini PROTEAN® Elektrophorese-System der Firma Bio-Rad (München) mit 1,5 mm Spacer verwendet. Die Laufstrecke im Sammelgel betrug 0,5 cm, im Trenngel 6 cm. In die Probentaschen wurden maximal 40 µl Probe gefüllt. Die 10%-igen Gele wurden nach folgendem Schema vorbereitet:

Verwendete Puffer:

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris / HCl pH 6,8

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris / HCl pH 8,8

Das Trenngel wurde mit den entsprechenden Mengen A.d. steril, 30%iger Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid (Rotiphorese® Gel 30 der Firma Roth, Karlsruhe), Trenngelpuffer, 10%ige Ammoniumpersulfatlösung (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED, Fa. Roth, Karlsruhe) angesetzt. Die Glasplatten wurden sorgfältig gereinigt und mit Ethanol entfettet, damit sich später ein rückstandsfreier Background im Westernblot ergibt. Das Trenngel wurde zwischen die in den Gießstand (Bio-Rad, München) eingespannten Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um es vor Oxidation zu schützen. Desweiteren wurde beim Gießen des Gels darauf geachtet, dass keine Luftblasen in das Gel miteingeschlossen werden. Nach 30 Minuten Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen, das Trenngel mit A.d. abgespült und mit Filterpapier getrocknet. Mit

dem fertig angesetzten Sammelgel (3,07 ml A.d. steril; 1,25 ml Sammelgelpuffer; 0,65 ml Acrylamidmix; 25 µl APS, 5 µl TEMED) wurde das Trenngel zwischen den Glasplatten randvoll überschichtet und sofort der Probentaschenkamm in die Gelkammer eingesetzt. Nach weiteren 30 Min. Polymerisation des Sammelgels wurden vor Verwendung der Kamm entfernt und die Geltaschen mit A.d. ausgespült. Die fertigen Gele wurden in feuchten Tüchern verpackt bei 4-8°C bis zu 7 Tage aufbewahrt.

Immer zwei Gele wurden in der Gelapparatur zusammengesetzt und die Pufferreservoirs mit 1:10 verdünntem 10x TGS Elektrodenpuffer (25 mM Tris; 125 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3; Bio-Rad, München) gefüllt. Nach kurzem Spülen der Taschen mit Puffer wurden die vorbereiteten Proteinproben luftblasenfrei auf die Gelspuren geladen. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurden 10 µl des Molekulargewichtsstandard Precisions Plus ProteinTM Standard Dual Color (Bio-Rad, München) parallel aufgetragen. Die Proteine wurden 15 Min. bei 90 V im Sammelgel und bei 150 V für ca. 1-1,5 h aufgetrennt, bis die blaue Lauffront das Gelende erreicht hatte. Der Nachweis der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte durch eine Westernblot-Analyse.

2.6.4 Westernblot

Mit Hilfe der Westernblot-Analyse können gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden (Towbin, Staehelin et al. 1979). Nach der SDS Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels einer Semidry-Blottingapparatur der Firma Bio-Rad auf hydrophobe PVDF-Transfer-Membranen (Millipore, Schwalbach) transfe-riert (Burnette 1981). Die verwendeten Immobilon-P PVDF-Transfer-Membranen haben im Vergleich zu Nitrocellulose-Membranen verbesserte Bearbeitungs- und Färbereigenschaften sowie eine größere Bindungskapazität für Proteine.

Für den Transfer wurde eine PVDF-Membran 5 Min. in Methanol gewaschen. Die Membran und zwei Blotting-Filterpapiere (Schleicher&Schüll, Bioscience Dassel) wurden auf Gelgröße zugeschnitten und in Methanol-haltigem Transferpuffer (10 % (v/v) 10x Blotting Buffer [10x Blotting Buffer: 15 g Tris, 72 g Glycin, 1 l A.d.]; 70 % (v/v) A.d.; 20 % (v/v) Methanol) eingeweicht. Methanol im Puffer diente dazu, das SDS aus den Protein-Detergens-Komplexen zu entfernen und die Bindung der SDS-freien Proteine an die PVDF-Membran zu erhöhen. Vom Gel wurde mit einem Skalpell vorsichtig das Sammelgel abgetrennt. Gel und Membran wurden nun nach

dem in Abbildung 9 abgebildeten Schema sandwichartig in 3MM-Whatmann-Filterpapier (Roth, Karlsruhe), welches als Ionenreservoir dient, gelegt. Es wurde

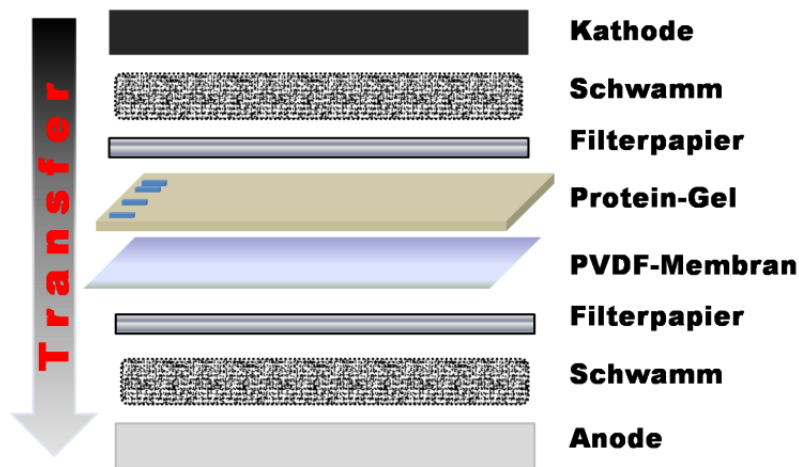


Abbildung 9: schematischer Aufbau des Westernblot

darauf geachtet, dass das Gel luftblasenfrei an der PVDF-Membran liegt. Nach Zusammensetzen aller Komponenten erfolgte im gekühlten Transferpuffer das Blotting mit 100 V für 2-2,5 h. Als Kontrolle für einen erfolgreichen Proteintransfer diente bei Bedarf eine reversible Anfärbung der Proteinbanden mit Ponceau-S-Lösung (0,1 % (w/v) Ponceau S in 5 % (v/v) Essigsäure; Sigma-Aldrich Steinheim). Nach dem Entfärben mit A.d. wurde die Membran anschließend für den Immunoblot verwendet.

2.6.5 Detektion der Proteine im Immunoblot

Die auf die Membran übertragenen Proteine können durch spezifische Antikörper in einer Antigen-Antikörperreaktion nachgewiesen werden. Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit in TBST (Trisbuffered Saline mit Tween) zu 4-8% gelöstem fettarmen Magermilchpulver abgesättigt. Durch Zugabe des nicht-ionischen Detergenz Tween® 20 (Serva Feinbiochemica, Heidelberg) im Verhältnis 1:1000 zu dem 1:10 vorverdünnten 10x TBS (50 mM Tris, 150 mM Natriumchlorid, pH 7,6) wird die Oberflächenspannung herabgesetzt und die Entfernung peripherer unspezifischer Membranproteine wird erleichtert. Auf dem Rollenmischgerät wurden die Membranen in 50ml-Falcons über Nacht (>12h) im Kühlschrank mit je 10 ml einer 5 % (w/v) fettarmen TBST-Milch bzw. für 1h bei Raumtemperatur in PBS mit 10 % (w/v) fettarmer TBST-Milch benetzt.

Zur Detektion der Proteine mit den entsprechenden Antikörpern wurde der Primärantikörper zu einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml in 5%iger TBST-Milch verdünnt und die PVDF-Membran darin für 1 h bei RT drehend inkubiert. Der in TBST-Milch verdünnte Primärantikörper wurde mehrfach verwendet und hierfür mit

2%igem Natrium-Azid versetzt (Endkonzentration: 0,02%), um eine mehrtägige Haltbarkeit der TBST-Milch bei 4°C zu gewährleisten. Überschüssiger Primärantikörper wurde durch dreimal 5-minütiges Waschen mit je 10 ml TBST-Milch entfernt.

Mit dem entsprechenden Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper (anti-mouse, 1:10.000 in 5%iger TBST-Milch) wurde die PVDF-Membran 30 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 min mit TBST gewaschen. Der Zweitantikörper wurde immer frisch angesetzt, da zugegebenes Natriumazid die Peroxidase-Aktivität hemmen würde.

Der Nachweis der immunreaktiven Proteine auf der PVDF-Membran wurde mit Chemolumineszenz¹⁸ geführt und hierfür wurde das "Enhanced Chemiluminescence"-System (ECL, Amersham™ Biosciences - GE Healthcare, Buckinghamshire UK) verwendet. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase katalysiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Oxidation des Lumigen PS-3 Acridan Substrates zu einem Acridinium-Ester Zwischenprodukt. Dieses aktivierte Zwischenprodukt reagiert unter alkalischen Bedingungen mit Peroxid und emittiert Licht, welches einen exponierten Röntgenfilm schwärzen kann.

Lösung A (Substrat-Lösung, welche Tris-Puffer enthält) und Lösung B (Acridan Substrat-Lösung in Dioxan und Ethanol) werden bei RT im Verhältnis 40:1 gemischt und die proteinbeladene Seite der Membran wurde in einer Plastikwanne genau 5 min mit 0,1 ml Substratlösung pro cm² Membranfläche bei RT inkubiert. Anschließend platzierte man die Membran in einer Filmkassette, tupfte überschüssiges Detektionsreagenz mit einem Tuch ab, deckte die Membran von oben mit einer durchsichtigen Plastikfolie luftblasenfrei ab und exponierte die CEA-Röntgenfilme in der Dunkelkammer. Die Entwicklung der Filme erfolgte im automatischen Filmentwickler (CP 1000, AGFA, Mortsel Belgien). Marker und Ränder der PVDF-Membran wurden per Hand auf dem entwickelten Film nachgetragen, um eine Orientierung bzgl. des Molekulargewichts zu ermöglichen. Das Einlesen der Filme erfolgte mittels eines Flachbett-Scanner (CanoScan 9950F, Canon, Krefeld) und die Bearbeitung der erhaltenen Bilder mit Adobe Photoshop® (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA). Analysiert wurden die Banden der Immunoblots mittels der Software ImageJ® (NIH) und QuantityOne® (BioRad).

¹⁸ S. Albrecht, H. Brandl, Th. Zimmermann: *Chemolumineszenz*. Hüthig Verlag, Heidelberg 1996.

2.6.6 Entfernung von Antikörpern von Membranen

Um primäre sowie sekundäre Antikörper wieder von PVDF-Membranen zu entfernen, wurden die Membranen für 15 min mit 10 ml "Stripping-Puffer" (Restore™ Western Blot Stripping Buffer, Thermo Scientific, Karlsruhe) gewaschen. Durch die pH-Veränderung werden die Antikörperbindungen von den Proteinen gelöst. Vor einem erneuten Blockierungsschritt mit TBST-Milch und einer weiteren Antikörper-Detektion wurden die PVDF-Membranen nochmals 2x 5 min. in TBST gewaschen. Für eine evtl. spätere Verwendung wurden die PVDF-Membranen bei -20°C gelagert und konnten, nach 15 sec. in Methanol gelegt und 3x 1 min. in TBST gewaschen, erneut mit 5-10%iger TBST-Milch blockiert werden.

2.7 Bildanalyse und Quantifizierung von Banden im Immunoblot

Die Banden der Immunoblots wurden mittels der auf Java basierenden Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungssoftware *ImageJ*®/NIH analysiert. Dieses von Wayne Rasband in seiner Arbeit am National Institut of Health (Bethesda, USA) entwickelte Programm überzeugt durch ein breites Anwendungsspektrum in der medizinischen und wissenschaftlichen Bildanalyse. Es wurde die Version ImageJ 1.43u aus dem Jahre 2010 verwendet.

Desweiteren nutzten wir für die densitometrische Auswertung der Banden das Programm *Quantity One*® 1-D Analysis Software (Biorad, München).

2.8 Statistische Auswertungen

Für die statistischen Auswertungen wurde die Software *Office Excel 2007*® von Microsoft verwendet. Der Student'sche t-Test wurde durchgeführt, um Signifikanz in den funktionellen Assays zwischen EMMPRIN-exprimierenden Zellen und solchen mit EMMPRIN-Silencing nachzuweisen. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert mit $p < 0,05$ festgelegt und in den Diagrammen jeweils mit * gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der EMMPRIN-Expression in humanen Harnblasenkarzinomzelllinien auf mRNA- und Protein-Ebene

Um die Bedeutung von EMMPRIN als potentielles Zielmolekül für zukünftige Tumorthherapie des Harnblasenkarzinoms näher charakterisieren zu können, wurde für diese experimentelle Forschungsarbeit folgender Schwerpunkt gesetzt: Untersuchung der molekularen Funktionen von EMMPRIN und der Auswirkungen einer Inhibition der EMMPRIN-Expression in humanen Harnblasenkarzinomzelllinien. Wir untersuchten die Expression von EMMPRIN in insgesamt neun Zelllinien, die aus Gewebe von Harnblasenkarzinomabschnitten abgeleitet wurden. Dafür wurde an den humanen Harnblasenkarzinomzelllinien RT112, J82, T24, 647V, EJ28, RT4, 468P, HT1376 und 253J die EMMPRIN-Expression auf mRNA Ebene mittels Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) und auf Proteinebene mittels Westernblot nachgewiesen. Als positiv-Kontrollen für die EMMPRIN-Expression in der RT-PCR verwendeten wir die Plasmid-DNA von pTREHygHEMMP. Den negativ-Kontrollen wurde keine c-DNA zugegeben. Die untersuchten Zelllinien zeigten in vitro auf mRNA-Ebene in der RT-PCR ein PCR-Amplifikat von der erwarteten Größe (Abbildung 10).

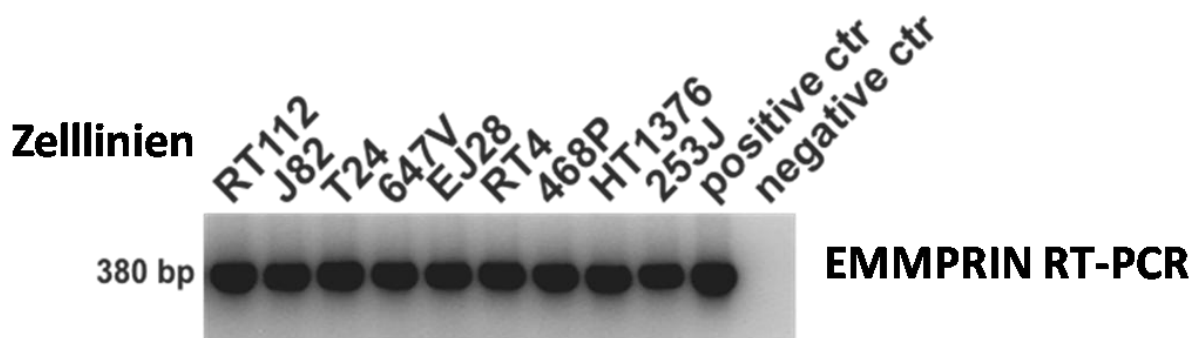


Abbildung 10: Analyse der EMMPRIN-Expression in der RT-PCR in humanen Harnblasenkarzinomzelllinien. Nachweis der EMMPRIN-Expression in neun Harnblasenkarzinomzelllinien auf mRNA-Ebene in der RT-PCR. Die positiv-Kontrolle stammte vom Plasmid pTREHygHEMMP, bei der negativ-Kontrolle wurde ohne cDNA gearbeitet.

Um anschließend die auf mRNA-Ebene nachgewiesene EMMPRIN-Expression auch auf Protein-Ebene näher zu betrachten, wurden Ganzzellextrakte dieser neun Harnblasenkarzinomzelllinien hergestellt und eine Gelelektrophorese mit anschließender Westernblot-Analyse durchgeführt (Abbildung 11).

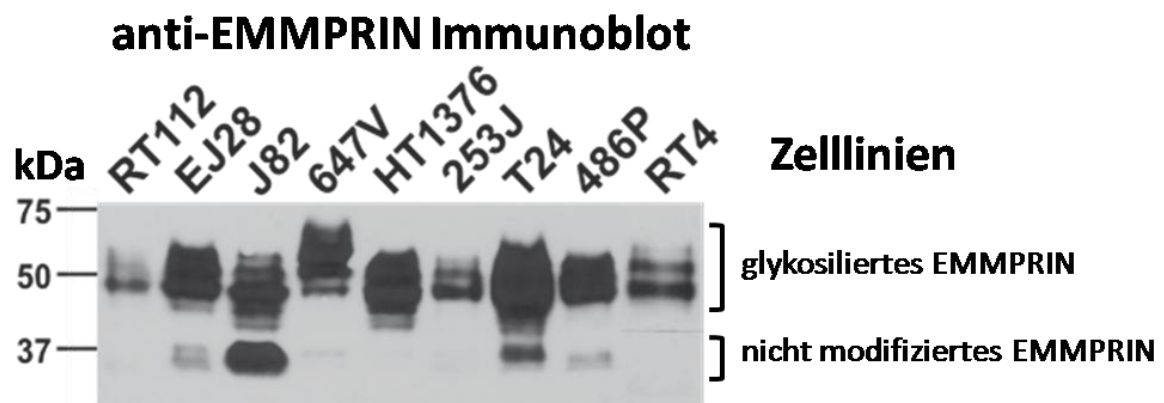


Abbildung 11: Analyse der EMMPRIN-Expression im anti-EMMPRIN Immunoblot in humanen Harnblasenkarzinomzelllinien. Zellkulturen der Harnblasenkarzinomzelllinien RT112, EJ28, J82, 647V, HT1376, 253J, T24, 486P und RT4 wurden mit Lysepuffer lysiert und jeweils 20µg Protein pro Bahn in der Gelelektrophorese aufgetragen. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgten der Nachweis der EMMPRIN-Proteine im Immunoblot mit einem Primärantikörper gegen EMMPRIN (HIM6) und die Belichtung der Banden auf einem Film über einen *horseradish-peroxidase* (HRPO)-konjugierten Sekundärantikörper.

Die Protein-Expression von EMMPRIN konnte in allen neun Zelllinien nachgewiesen werden. Unterschiede bestanden hinsichtlich der Expressionsstärke und der Molekulargewichte der aufgetrennten Protein-Banden. In einigen Zelllinien wurde zusätzlich zu der nicht modifizierten Bande bei 35 kDa eine EMMPRIN-Bande bei 45-65 kDa im Westernblot sichtbar. Diese Banden gaben Aufschluss über die unterschiedliche Glykosylierung mit Polysaccharidseitenketten, die an den beiden extrazellulären Immunglobulin-domänen (Ig-Domänen) vorliegen können.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sowohl auf mRNA-Ebene in der RT-PCR als auch auf Proteinexpressions-Ebene im anti-EMMPRIN-Immunoblot EMMPRIN in allen untersuchten Harnblasenkarzinomzelllinien nachgewiesen wurde.

3.2 EMMPRIN-Expression im Harnblasenkarzinom-Gewebe

Um zu zeigen, dass EMMPRIN im Harnblasenkarzinom exprimiert ist, haben wir an Karzinom-Gewebe von sechs verschiedenen Patienten mit unterschiedlichen Tumorstadien des Harnblasenkarzinoms mittels Immunhistochemie die Expression von EMMPRIN untersucht. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass EMMPRIN auf Gewebsschnitten von Harnblasenkarzinomen aus unterschiedlichen Patienten mit einer immunhistologischen Färbung nachzuweisen ist. EMMPRIN war hierbei vorwiegend membranständig lokalisiert. In den Tumorstadien Ta, T1 und T2 und in allen drei Differenzierungsgraden G1 bis G3 lies sich das EMMPRIN-Protein an den Zellmembranen anfärben.

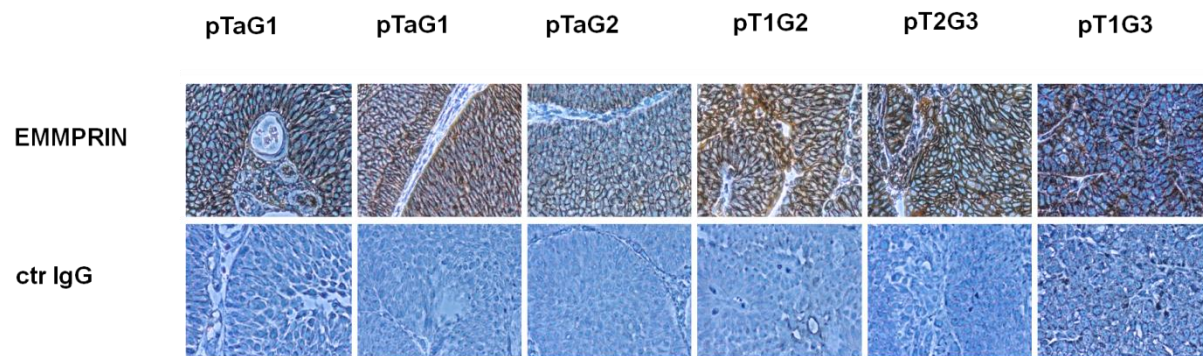


Abbildung 12: Immunhistologische Färbung von EMMPRIN: EMMPRIN-Expression auf Blasen Tumorgewebe verschiedener Tumorstadien. Die Lokalisation ist überwiegend membranständig.

Die obere Reihe in Abbildung 12 zeigt die Färbung auf EMMPRIN, in der unteren Reihe ist jeweils ein Ausschnitt aus der Färbung mit dem Kontroll-Immunglobulin dargestellt.

3.3 EMMPRIN-Expression im TMA Harnblasenkarzinom

Um den in-vitro Experimenten im Rahmen dieser Arbeit eine klinische Basis zugrunde zu legen, wurde in Kooperation mit der Pathologie der Universität Erlangen unter A. Hartmann und J. Lehmann von der Urologischen Gemeinschaftspraxis *Prüner Gang* in Kiel ein Tissue-Micro-Array (TMA) angefertigt. Dessen Endauswertung stand noch nicht zur Verfügung, jedoch zeigten erste vorläufige Analysen der Ergebnisse interessante Tendenzen. Von Patienten mit histologisch gesichertem Blasen tumor in verschiedenen Stadien wurde nach transurethraler Resektion des Blasen tumors (TUR-B) das Gewebe hinsichtlich seiner EMMPRIN-Expression untersucht und der weitere Patientenverlauf mit Gesamtüberleben der Patienten weiterverfolgt. Die vorläufige Auswertung dieses TMA zeigte, dass EMMPRIN in Abhängigkeit von Tumorstadium und Differenzierungsgrad im Harnblasenkarzinom exprimiert wird. Bei der Betrachtung der Überlebensrate der Patienten ergab sich für Patienten, welche an einem Blasen tumor mit starker EMMPRIN-Expression litten, tendenziell ein schlechteres Überleben im Vergleich zu Patienten mit EMMPRIN-negativem Harnblasen tumor. Auch die Gesamtüberlebensrate bei Patienten mit einer starken EMMPRIN Expression in den Harnblasenkarzinomzellen war niedriger, als bei der Gruppe mit einer schwachen EMMPRIN Expression.

Die Untersuchungen in diesem TMA legten die Vermutung nahe, dass die EMMPRIN-Expression im humanen Harnblasenkarzinom eine Rolle für das

Tumorstadium, den Differenzierungsgrad und das Gesamtüberleben der Patienten spielen.

3.4 Etablierung von Modellen für die Modifikation der EMMPRIN-Expression

Zur funktionellen Analyse von EMMPRIN im Harnblasenkarzinom wurde durch RNA-Interferenz (RNAi) eine spezifische Inhibition der EMMPRIN-Expression auf mRNA-Ebene in den Harnblasenkarzinomzellen induziert. Diese Inhibition der EMMPRIN-Expression wird im Folgenden als EMMPRIN-Silencing bezeichnet. Es wurden drei verschiedene Methoden gewählt, um eine Modifikation der EMMPRIN-Expression zu erreichen: Drei spezifische siRNA-Oligonukleotiden EMMPsi1, EMMPsi2 und EMMPsi3 gegen EMMPRIN für ein transientes Silencing. Eine stabile Reduktion der EMMPRIN-Expression über die Infektion und Transduktion mit Lentivirus-vermittelter shRNA. Und als Drittes ein Tetrazyklin-induzierbares konditionales Expressionssystem, mit welchem die EMMPRIN-Expression gezielt moduliert werden konnte. Die EMMPRIN-Sequenzen, gegen welche sowohl die siRNA-Oligonukleotide, als auch die shRNA im lentiviralen Transduktionsmodell bzw. im tetrazyklininduzierbaren Expressionssystem gerichtet waren, waren für alle drei Methoden identisch. Ziel war es, Zellklone mit reduzierter EMMPRIN-Expression im Vergleich zur Ursprungszelllinie zu generieren und diese in einem weiteren Schritt in verschiedenen funktionellen Assays zu untersuchen. Die siRNA-Technologie musste für diese Untersuchungen in den entsprechenden Methoden erst etabliert werden. Dafür wurden die Transfektionsbedingungen wie Zellzahl, Zelldichte in der Kultur, Zeitpunkte und Konzentrationen der Transfektionen, Transduktionen und Infektionen für ein maximales EMMPRIN-Silencing optimiert und für die jeweilige Zellkultur angepasst.

3.4.1 Transientes EMMPRIN-Silencing mit si-RNA-Oligonukleotiden und maximales Silencing an den Tagen d3-d5

Spezifische siRNA-Oligonukleotide EMMPsi1, EMMPsi2 und EMMPsi3 mit der entsprechenden EMMPRIN-Sequenz wurden mittels transienter Transfektion in die Harnblasenkarzinomzelllinien RT112 und T24 eingebracht. Anschließend wurde die Proteinexpression von EMMPRIN an den Tagen 1-3 nach Transfektion im Westernblot analysiert. Ziel war eine gezielte Expressionshemmung der EMMPRIN-Expression in Harnblasenkarzinomzellen. Als negativ-Kontrolle, in dieser Arbeit mit ctrl.-si bezeichnet, diente ein Oligonukleotid, welches nicht spezifisch die EMMPRIN-

mRNA bindet, sondern als zufällige si-RNA ohne spezifische anti-EMMPRIN Sequenz in den Zellen keinen Effekt zeigt.

Alle drei verwendeten Oligonukleotidkonstrukte EMMPsi1, EMMPsi2 und EMMPsi3 zeigten in RT112-Zellen (Abbildung 13) und T24-Zellen (Abbildung 14) ein deutliches EMMPRIN-Silencing um mehr als 50% am Tag 3 im Vergleich zu der Kontroll-siRNA ctrl.-si.

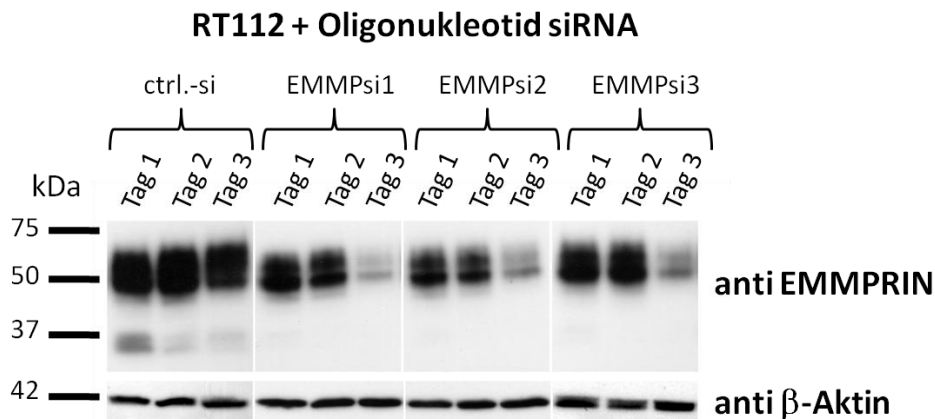


Abbildung 13: EMMPRIN-Silencing durch siRNA-Oligonukleotiden in RT112 an drei aufeinanderfolgenden Tagen nach Transfektion. RT112-Zellen wurden am Tag d0 mit den siRNA-Oligonukleotidkonstrukten ctrl.-si, EMMPsi1, EMMPsi2 und EMMPsi3 transfiziert und an den folgenden Tagen d1-3 die entsprechenden Lysate hinsichtlich ihres EMMPRIN-Expressionsmusters in der Gelelektrophorese und im Westernblot untersucht. Am Tag d3 erzielte Konstrukt EMMPsi1 eine Expressionsreduktion um 80%, EMMPsi2 um 50% und EMMPsi3 um 20% (Auswertung mit ImageJ®/NIH).

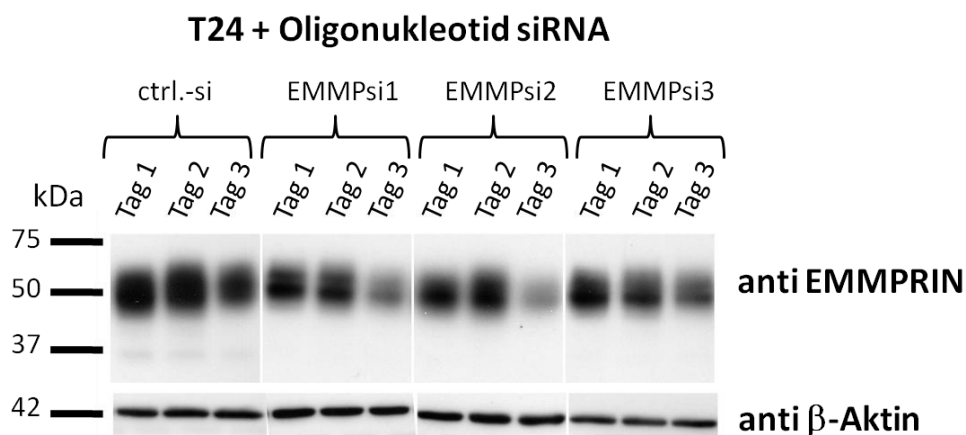


Abbildung 14: EMMPRIN-Silencing durch siRNA-Oligonukleotiden in T24 an drei aufeinanderfolgenden Tagen nach Transfektion. T24-Zellen wurden am Tag d0 mit den siRNA-Oligonukleotidkonstrukten ctrl.-si, EMMPsi1, EMMPsi2 und EMMPsi3 transfiziert und an den folgenden Tagen d1-3 die entsprechenden Lysate hinsichtlich ihres EMMPRIN-Expressionsmusters in der Gelelektrophorese und im Westernblot untersucht. Am Tag d3 erzielte Konstrukt EMMPsi1 eine Expressionsreduktion um 30%, EMMPsi2 um 50% und EMMPsi3 um 30% (Auswertung mit ImageJ®/NIH).

Insgesamt beobachtete man für das Konstrukt EMMPsi1 in RT112-Zellen die effektivste Expressionsreduktion, weshalb bevorzugt dieses Konstrukt in den

daraufliegenden funktionellen Assays an den Tagen maximalen Silencings verwendet wurde. Zum Nachweis, dass in der Gelelektrophorese pro Spur gleiche Mengen an Protein (20 µg) aufgetragen wurden, diente hier eine Detektion von β -Aktin mit einem entsprechenden Antikörper im darunter abgebildeten Immunoblot.

In einem weiteren Schritt wurde nun über einen Zeitraum von 5 Tagen in RT112-Zellen der Verlauf des EMMPRIN-Expressionslevels beobachtet, nachdem an Tag d0 eine Transfektion mit den Oligonukleotiden ctrl.-si, EMMPsi1 bzw. EMMPsi2 durchgeführt wurde. Am Tag d2 war nur eine diskrete Bandenabschwächung zu sehen, am Tag d4 war das Maximum der Inhibition der Genexpression von EMMPRIN festzustellen und ab Tag d5 stieg das EMMPRIN-Expressionslevel wieder an. Nach diesem Zeitraum stieg der EMMPRIN-Level der Zellkultur wieder auf das Ausgangsniveau vor si-Oligonukleotid-Transfektion und es ließen sich im Immunoblot keine Unterschiede mehr in der EMMPRIN-Produktion der Harnblasenkarzinomzellen nachweisen. Der maximale Knockdown um mehr als 60% der EMMPRIN-Expression im Vergleich zu der Kontrolle zeigte sich in dieser Versuchsreihe auf Proteinebene am Tag d4 nach Transfektion (Abbildung 15).

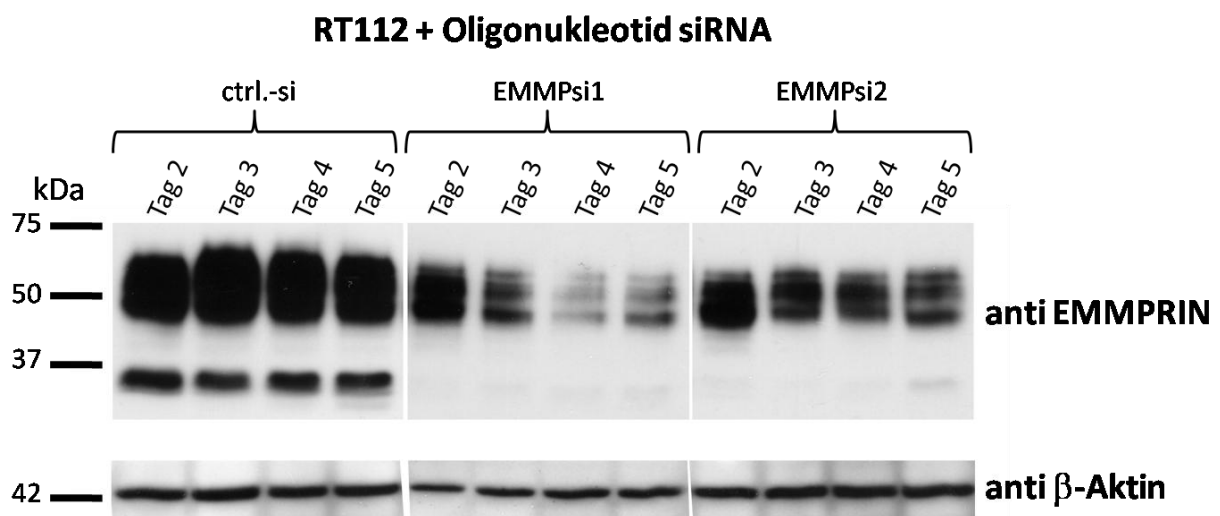


Abbildung 15: EMMPRIN-Silencing durch siRNA-Oligonukleotiden in RT112 an den Tagen d2-5 nach Transfektion. RT112-Zellen wurden am Tag d0 mit den siRNA-Oligonukleotidkonstrukten ctrl.-si, EMMPsi1 und EMMPsi2 transfiziert und die Lysate der Zellen an den folgenden Tagen d2-5 hinsichtlich ihres EMMPRIN-Expressionsmusters untersucht. Das Oligonukleotid-Konstrukt EMMPsi1 bewirkte an den Tagen d2-5 eine Inhibition der EMMPRIN-Expression um 10%, 10%, 60% und 40% im Vergleich zu den Zellen, welche mit der ctrl.-siRNA transfiziert wurden (Auswertung mit ImageJ®/NIH).

Wie die in Abbildung 15 unterhalb abgebildeten Banden der Antikörperfärbung mit β -Aktin zeigen, wurden wieder gleiche Mengen Protein (20 µg) in der Gelelektrophorese geladen.

Die Ergebnisse im Immunoblot zeigten, dass eine transiente Inhibierung der EMMPRIN-Expression durch Einbringen von spezifischen si-Oligonukleotiden gegen die EMMPRIN-Sequenz der mRNA in den RT112-Zellen Reduktionsraten der EMMPRIN-Expression von über 80% hervorruft. Um dieses System in mehreren unterschiedlichen Harnblasenkarzinomzelllinien zu etablieren, wurde anschließend in den Zelllinien RT112, T24 und 647 V das Silencing von EMMPRIN durch die siRNA-Oligonukleotide EMMPsi1 und EMMPsi2 untersucht. Es zeigte sich für alle verwendeten verschiedenen Harnblasenkarzinomzelllinien eine Abnahme der EMMPRIN-Expression im Westernblot, wie in Abbildung 16 verdeutlicht ist. In RT112 wurde die Expression von EMMPRIN um 70% und in T24 und 647V um 60% reduziert. Als Kontrolle für die geladene Proteinmenge diente wieder der anti- β -Aktin Immunoblot.

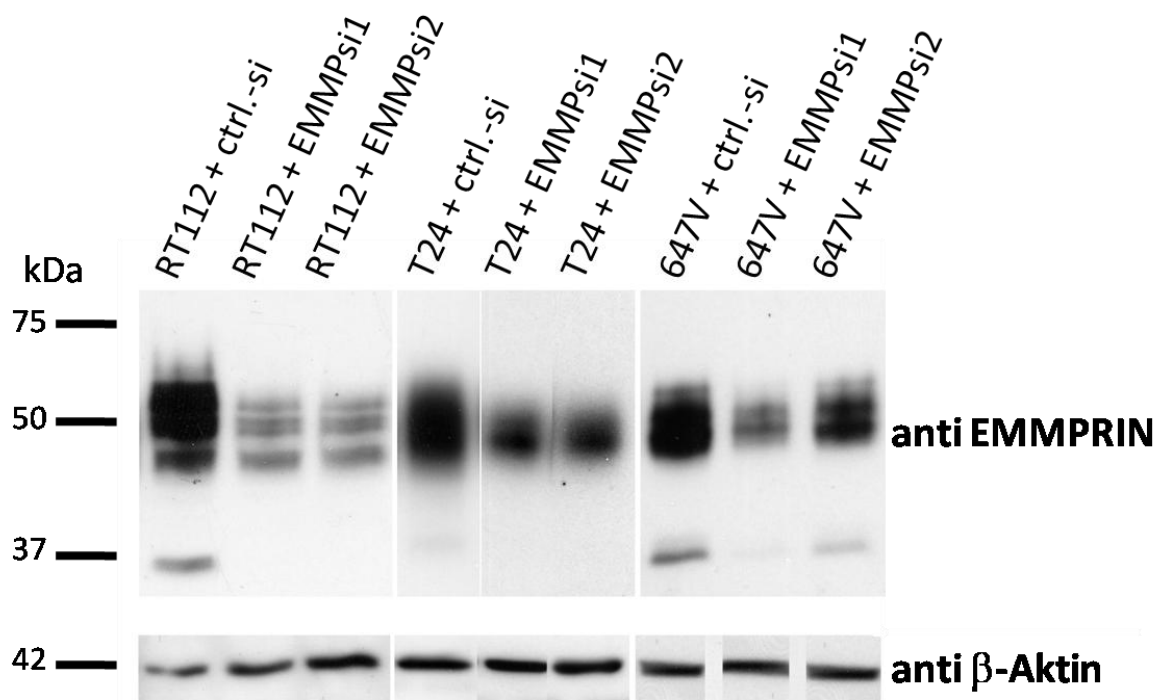


Abbildung 16: siRNA-Oligonukleotid vermittelte transiente Inhibition der EMMPRIN-Expression. Die humanen Harnblasenkarzinomzelllinien RT112, T24 und 647V wurden mit den siRNA-Oligonukleotiden ctrl.-si, EMMPsi1 bzw. EMMPsi2 transfiziert und anschließend im Westernblot auf EMMPRIN/CD147 detektiert. Es zeigte sich ein EMMPRIN-Silencing um 70% in den RT112 und um 60% in T24 und 647V (ImageJ®/NIH). Als Kontrolle, ob gleiche Proteinmengen (20 μ g) in der Gelelektrophorese der Zelllysate geladen wurden, diente ein Immunoblot mit β -Aktin.

Aufgrund dieser Vorversuche wurden für anschließende funktionelle Experimente die Zelllinien RT112 und T24 ausgewählt, da sie sich besonders effektiv mit den von uns verwendeten si-Oligonukleotiden EMMPsi1 bzw. EMMPsi2 und den verwendeten

Transfektionsreagenzien transfizieren ließen und ein effektives EMMPRIN-Silencing zeigten.

Da diese Methode der induzierten RNA-Interferenz zur Ausschaltung der EMMPRIN-Expression durch die synthetischen siRNA-Moleküle in Form der si-Oligonukleotide nur transient über wenige Tage wirksam war, suchten wir zusätzlich nach der Möglichkeit eines dauerhaft stabilen Silencings des EMMPRIN-Gens.

3.4.2 Stabiles EMMPRIN-Silencing nach Lentivirus vermittelter Transduktion der Harnblasenkarzinomzellen mit shRNA

Um die shRNA (s. 2.4.3) gegen das EMMPRIN-Protein in den Zellen stabil zu etablieren, welche dadurch unbegrenzt ein herunterreguliertes EMMPRIN-Level besitzen, haben wir ein lentivirales Infektionssystem (Wiznerowicz and Trono 2003) mit einem Virusvektor in Harnblasenkarzinomzellen etabliert. Der Vorteil dieser Methode bestand darin, dass über Infektion der Zellen shRNA-Expressionsvektoren in die genomische DNA der Zelle integriert wurden, durch welche eine ständige intrazelluläre Synthese der anti-EMMPRIN shRNA induziert und ein dauerhaftes EMMPRIN-Silencing möglich wurde. Das von uns verwendete lentivirale System basierte auf den Plasmiden pLVTHM und pLVTHMEMMPsh2¹⁹ (Sidhu, Nawroth et al. 2010).

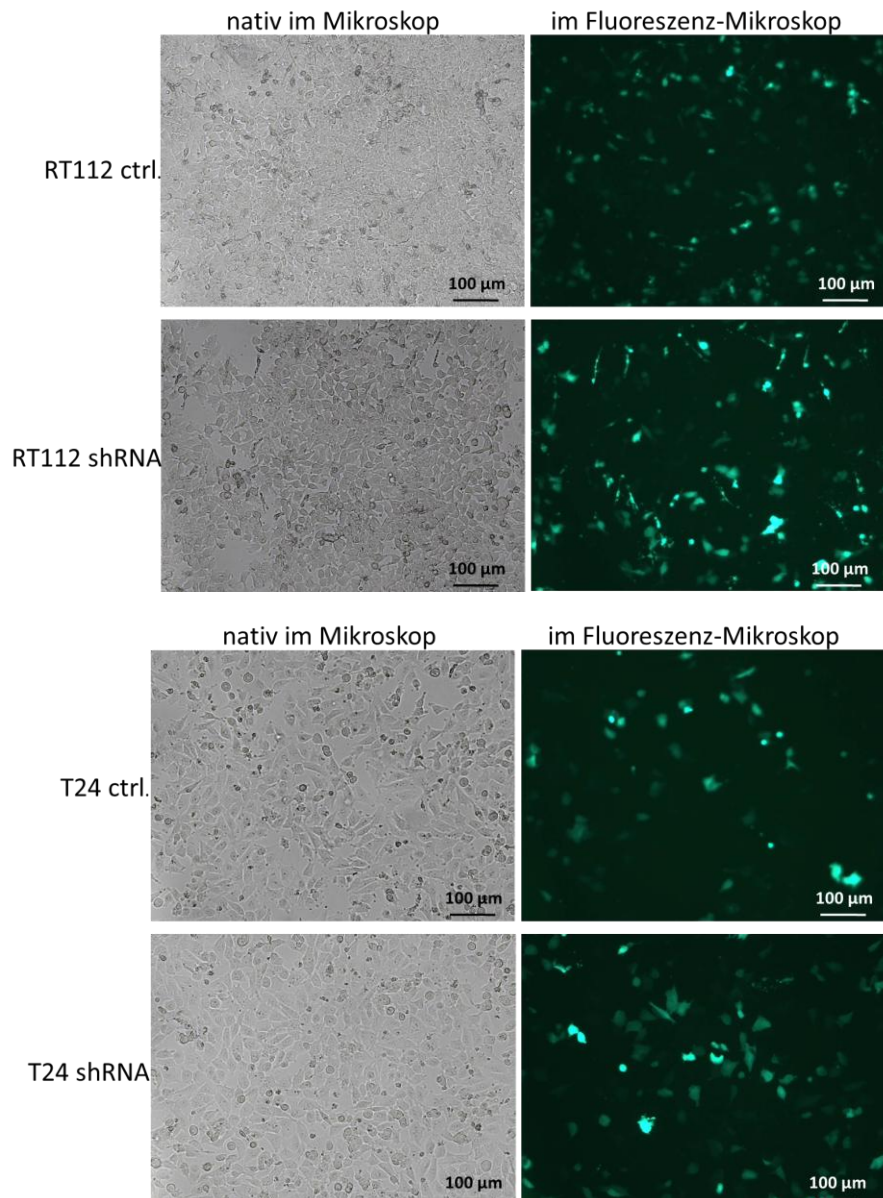
Als negativ-Kontrolle diente der lentivirale Vektor pLVTHM. Der Einfachheit halber wird im Folgenden mit pLVTHM und pLVTHM-EMMPsh2 das jeweilige Lentivirus bezeichnet.

3.4.2.1 Testung der Infektionseffizienz mittels GFP

Über das von uns benutzte lentivirale System exprimierten die Zellen auch ein Reporter-Gen für „Green Fluorescent Protein“ (GFP). Zur Kontrolle der Infektionseffizienz der Zellen mit den Lentiviren, welche die Plasmide pLVTHM (negativ-Kontrolle) bzw. pLVTHMEMMPsh2 enthielten, untersuchten wir die Virus-infizierten Zellen hinsichtlich ihrer GFP-Expression. Diejenigen Zellen, welche grün leuchteten, waren erfolgreich mit dem Virus infiziert worden. So konnte schon am Fluoreszenzmikroskop ein Eindruck über die Effizienz der Infektion mit dem Virus gewonnen werden und wir konnten auf eine hohe Infektionsrate und eine daraus resultierende Transduktionsrate der Zellkultur und ein entsprechend effektives EMMPRIN-Silencing der Harnblasenkarzinomzellen schließen. 24h nach der jeweiligen Transfektion der Zellen mit dem Lentivirus und der daraus resultierenden

¹⁹ Vgl.: <http://tronolab.epfl.ch/page58120.html> vom 03.12.2009.

Transduktion mit den jeweiligen Plasmiden wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Abbildungen 17 a) und b) zeigen Beispiele für mehrere GFP exprimierende Zellkulturen, welche im Fluoreszenzmikroskop unterschiedliche Infektionsraten besaßen.



Abbildungen 17 a) und b): RT112 bzw. T24 transduziert mit GFP und shRNA gegen die EMMPRIN-Sequenz mittels Lentivirus. In der linken Spalte wurde jeweils ein Bild der Zellkultur im Lichtmikroskop aufgenommen (Auflösung: 50x). Im rechten Fenster ist derselbe Ausschnitt im Fluoreszenzkanal abgebildet und alle Zellen, die GFP exprimierten, leuchteten deutlich durch ihre Fluoreszenz. Verglichen wurden die Zellen pLVTHM-ctrl. (obere Zeile) mit Zellen, welche die shRNA gegen EMMPRIN exprimierten (untere Zeile).

Die genauen Prozentzahlen der virusinfizierten Zellen wurden im Durchflusszytometer bestimmt. Für die RT112- und T24-Harnblasenkarzinomzelllinien ergaben sich folgende Auswertungen (Abbildung 18 und Abbildung 19):

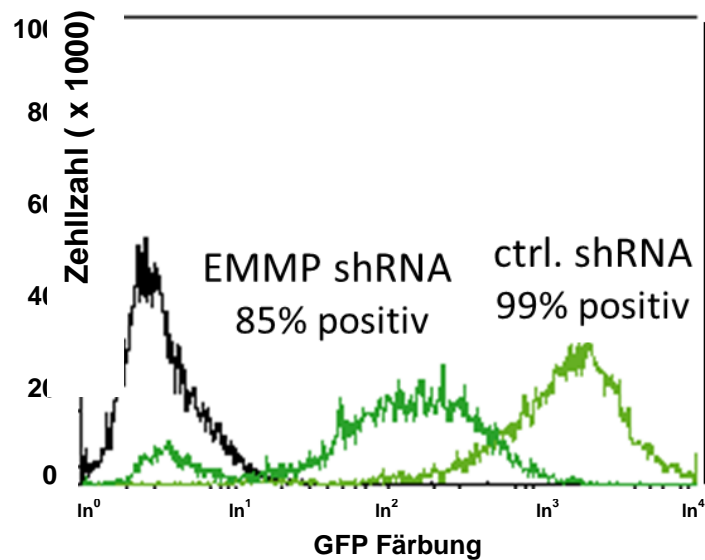


Abbildung 18: Lentivirus-vermittelte Transduktion von RT112-Zellen mit EMMPRIN-shRNA bzw. ctrl.-shRNA. Im FACS wurden durch die Messung der GFP-Expression Infektionseffizienzen mit dem Lentivirus von 85-100% gemessen.

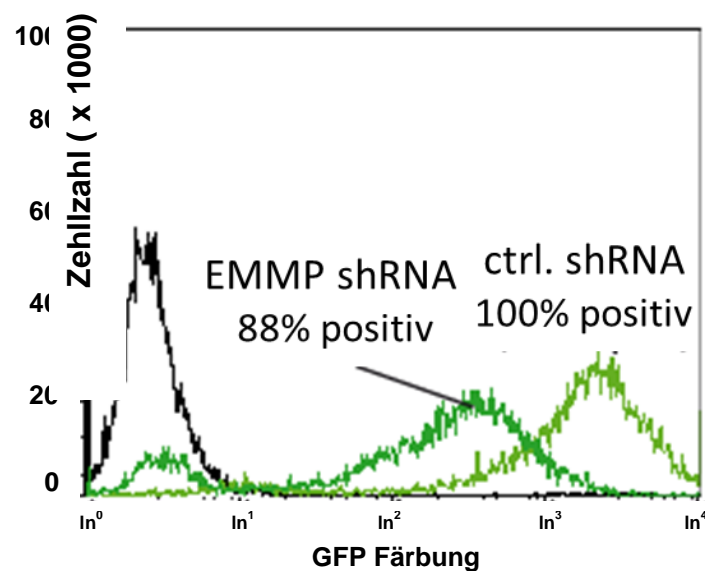


Abbildung 19: Lentivirus-vermittelte Transduktion von T24-Zellen mit EMMPRIN-shRNA bzw. ctrl.-shRNA. Im FACS wurden durch die Messung der GFP-Expression Infektionseffizienzen mit dem Lentivirus von 88-100% gemessen.

Unter optimierten Bedingungen konnten wir für RT112 und T24 Infektionseffizienzen von 85-100 % der vitalen Zellen erreichen, womit diese Zellen ein stabiles EMMPRIN-Silencing zeigen sollten.

3.4.2.2 Inhibition der EMMPRIN-Protein-Expression

Wir wollten nun wissen, ob die erfolgreich via lentiviraler Vektoren mit der shRNA gegen die EMMPRIN-Sequenz transduzierten Zellen tatsächlich eine Inhibition in ihrer EMMPRIN-Expression besitzen. Die Ergebnisse der im Folgenden durchgeführten Westernblot-Analyse der entsprechenden Ganzzelllysate bestätigen

diese Annahme. Abbildung 20 zeigt, dass die Expression des EMMPRIN-Protein in den verwendeten humanen Harnblasenkarzinomzelllinien bis zu 80 % gehemmt wurde. Im Vergleich hierzu zeigten die mit dem pLVTHM-enthaltenden Virus infizierten, d.h. mit der Kontroll-shRNA transduzierten Zelllinien als negativ-Kontrollen keine veränderte EMMPRIN-Expression.

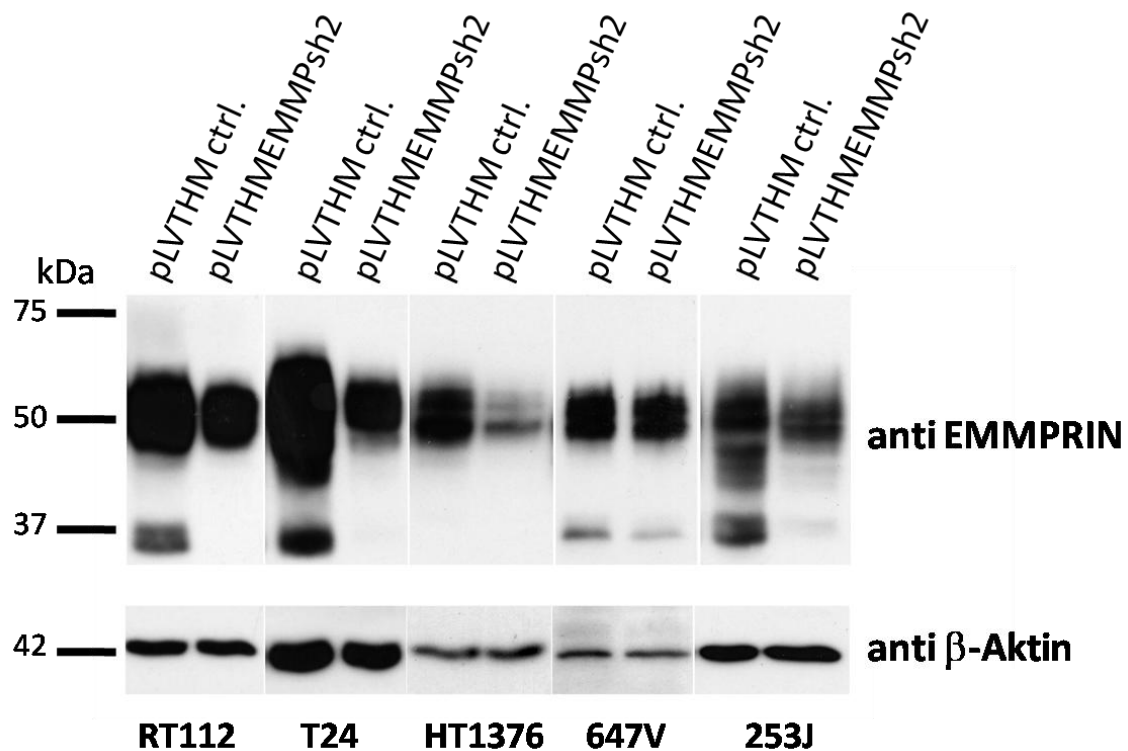


Abbildung 20: Herunterregulierung der EMMPRIN-Expression mittels Lentivirus-induzierten shRNA-Silencings in RT112, T24, HT1376, 647V und 253J. Die abgebildeten humanen Harnblasenkarzinomzelllinien wurden mittels Lentivirusinfektion zu shRNA-Produktion gegen das EMMPRIN-Protein stabil transduziert. Es zeigte sich eine Inhibition der EMMPRIN-Expression um bis zu 60% (ausgewertet mit ImageJ® NIH).

Der lentivirale Plasmidvektor induzierte einen Knockdown des EMMPRIN-Levels in RT112 um 60%, in T24 um 80%, in HT1376 um 85%, in 647V um 2% und in den 253J-Zellen um 50%. Zur Kontrolle der in der Gelelektrophorese geladenen Proteinmengen wurde im Anschluss ein Immunoblot mit Antikörpern gegen β -Aktin durchgeführt.

3.4.3 Stabiles EMMPRIN-Silencing mittels des konditionalen TetON-Expressionssystems

Um die Effekte einer dauerhaften konstitutiven Inhibition der EMMPRIN-Expression kontrolliert zu charakterisieren, haben wir in Urothelkarzinom-Zellen ein Tetrazyklin-induzierbares konditionales Expressionssystem etabliert. Vorteil war hierbei, dass die genetisch veränderten Zellen sowohl Kontrollzellen als auch Versuchszellen waren.

Wie im Material- und Methodenteil beschrieben (s. 2.4.4), wurden die Zellen zuerst mit dem Plasmid pTETON transfiziert. Über pTETON konnte in den Zellen spezifisch die Expression derjenigen Gene supprimiert werden, welche unter Kontrolle des entsprechenden Promotorkonstruktes lagen. Unser Ziel war die Expressionshemmung des Gens für EMMPRIN. Somit wurden in einem zweiten Schritt danach die entsprechenden Plasmide für die shRNA zur spezifischen Expressionshemmung von EMMPRIN in die Zellen transfiziert. Durch die Co-Transfektion mit diesen Plasmiden konnten wir im Rahmen des Tetrazyklin-induzierbaren Expressionssystems TetON gezielt die Transskription der entsprechenden shRNA gegen EMMPRIN beeinflussen. Vorteil dieser Methode war eine 100%ige Transfektion der Zellen mit den entsprechenden Plasmiden für das induzierbare konditionale Expressionssystem TetON und somit auch die Vermeidung einer Mischkultur, wie sie im Rahmen der Infektion mit den Lentiviren entstehen könnte.

3.4.3.1 Etablierung eines pTETON/pTRE2 HygLuc positiven Zellklons

In einem ersten Schritt wurden die Zelllinien CHO, RT112, T24 und HT1376 mit dem Plasmid pTETON transfiziert und für eine Woche im Kulturmedium entsprechend der auf dem Plasmid enthaltenen Resistenzgene mit Geneticin selektioniert und subkloniert. Dadurch wurden nur Zellen weiter kultiviert, welche das Plasmid erfolgreich integriert hatten. Die einzelnen Klone wurden zur Überprüfung auf eine erfolgreiche Integration eines funktionsfähigen pTETON-Plasmids in den Zellen folgendermaßen in einem Luciferase-Assay analysiert:

Die Zellen wurden mit dem Plasmid pTRE2 HygLuc transfiziert, welches für eine tet-induzierbare Luciferase kodiert. Um die transienten Transfektionseffizienzen zu überprüfen, wurden die Zellen zusätzlich mit dem Plasmid pRenilla transfiziert, welches für eine konstitutiv exprimierte Renilla-Luciferase kodiert. Diese beiden Luciferasen erzeugten, wenn sie von den Zellen exprimiert wurden, ein Lumineszenzsignal, welches im Photometer gemessen werden konnte. Diese Luciferasen-Aktivität trat nur in Zellen auf, deren TetON-System durch Gabe des Tetrazyklins Doxycyclin über 24 h aktiviert wurde und eine entsprechende Genexpression der Luciferasen ermöglichte. D.h. es konnten die pTETON-Transfektionseffizienz in der entsprechenden Zellkultur und der am effektivsten über das pTETON-System zur Genexpression induzierbare Zellklon ermittelt werden.

Exemplarisch sind die Ergebnisse der T24-Zellen im Diagramm 2 dargestellt:

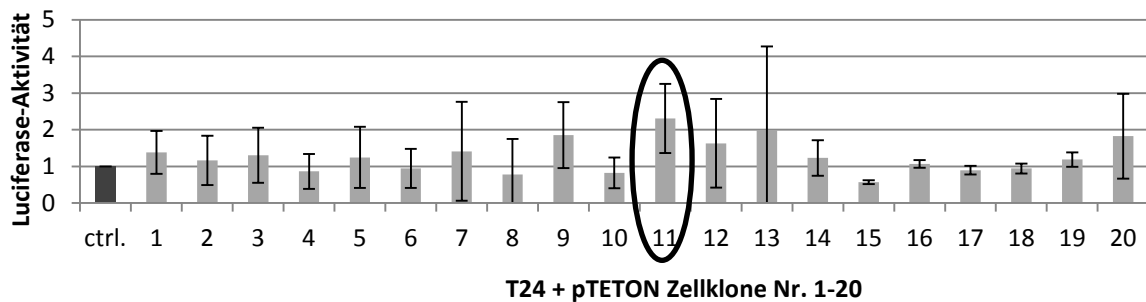


Diagramm 2: Luciferase-Aktivität in T 24. T24 wurden in einem ersten Schritt mit dem pTETON-Plasmid stabil transfiziert und dann nach transienter Co-Transfektion mit den Plasmiden pTRE HygLuc und pRenilla in einem Luciferase-Assay untersucht. Gemessen wurde die Firefly-Luciferase-Aktivität in den Zellen 24h nach Simulation des TetON-Systems mit Doxycyclin. Als Kontrollen „ctrl.“ dienen unstimulierte Zellen. Es wurden insgesamt acht Testreihen durchgeführt.

Es wurden insgesamt acht Testreihen dieses Luciferase-Assays durchgeführt, bei welchen sich schließlich der Zellklon Nr. 11 als konstant stabil in der Expression des TetON-Systems und in seiner Induzierbarkeit zur gezielten Genexpression in diesem TetON-System erwies. Dieser Zellklon zeigte in allen Versuchsreihen eine Luciferase-Aktivität deutlich über dem Wert der Kontrolle „ctrl.“. Somit wurde dieser Klon unter dem Namen „T24+pTETON Klon Nr.11“ weitergeführt und zur Transfektion mit den Plasmiden für die spezifische shRNA vorbereitet. Hiermit konnte in dieser Arbeit gezielt ein induzierbares konditionales System sowohl zur Herunterregulation der Gen-Expression als auch für eine mögliche Gen-Überexpression mittels shRNA in Harnblasenkarzinomzellen etabliert werden.

3.4.3.2 Klonierung von spezifisch gegen EMMPRIN gerichteten shRNA-Oligonukleotiden in das Plasmid pENTR

Es sind nun weitere Plasmide auf der Basis des Expressionsplasmides pENTR im Vorfeld kloniert, sequenziert und zur Verwendung im Tet-ON-System von unserer Arbeitsgruppe etabliert worden. Hinsichtlich der Vorgehensweise sei hier auf die entsprechenden Kapitel im Material- und Methodenteil verwiesen. Diese neu klonierten Expressionsplasmide mit den Bezeichnungen pENTR-EMMPsh1, pENTR-EMMPsh2 und pENTR-EMMPsh3 konnten für eine konstitutive also stabile EMMPRIN-Expressionshemmung eingesetzt werden bzw. das Plasmid pENTR-LacZ2.1 konnte als negativ-Kontrolle ohne Einfluss der shRNA auf die EMMPRIN-Expression eingesetzt werden. Diese Plasmide konnten im Rahmen des Tetrazyklin-induzierbaren Expressionssystems TetON gezielt die Transkription der entsprechenden shRNA mit der EMMPRIN-Sequenz induzieren.

3.4.3.3 Stabile Inhibition der EMMPRIN-Expression

Um die Effekte einer Inhibition der EMMPRIN-Expression durch die shRNA zu messen, wurde nach Induktion des TetON-Systems in T24 Harnblasenkarzinomzellen die EMMPRIN-Expression im Western Blot dargestellt.

Die Untersuchung der Zelllysate hinsichtlich ihres EMMPRIN-Expressionsmusters nach Induktion der Inhibition der EMMPRIN-Expression über das pTETON-System ist in Abbildung verdeutlicht. Die Kontroll-shRNA, welche über pENTR-LacZ2.1 bei Stimulation der Zellkultur mit 1µg/10ml Doxycyclin angeschaltet wurde, zeigte keinen Effekt. Dagegen waren bei den drei shRNA-Konstrukten EMMPsh1, EMMPsh2 und EMMPsh3 deutliche Abschwächungen der Banden um mehr als 95% in den mit gleicher Menge Doxycyclin stimulierten Zellklonen festzustellen (s. Abbildung 21). Es ließ sich also auch hier eine deutliche Abnahme der EMMPRIN-Expression feststellen.

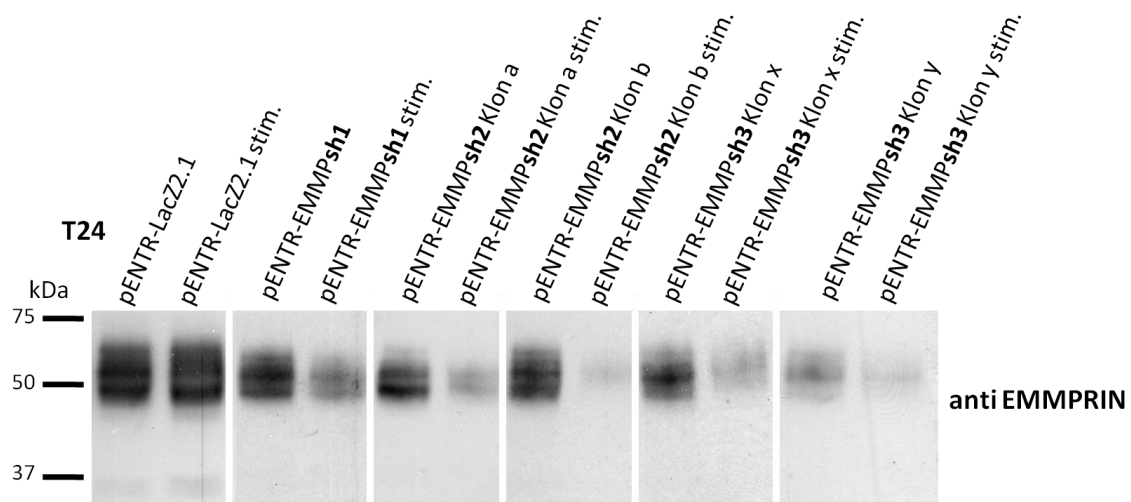


Abbildung 21: Konstitutive Inhibition der EMMPRIN-Expression in T24 Harnblasenkarzinomzellen mittels des Doxzyklin-induzierbaren pTETON-Systems. Ganz links ist die Kontrolle pENTR-LacZ2.1 dargestellt. Die anderen Bandenpaare zeigten jeweils native EMMPRIN-Level vs. Inhibition der EMMPRIN-Expression, wenn die spezifische shRNA-Produktion gegen die EMMPRIN-Sequenz stimuliert wurde. Die EMMPRIN-Expression wurde um mehr als 95% inhibiert (ImageJ®/NIH).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass durch alle drei verwendeten Methoden die EMMPRIN-Expression in diversen humanen Harnblasenkarzinomzelllinien beeinflusst werden konnte: Die siRNA-Oligonukleotide zeigten durch direktes Einbringen der siRNA gegen EMMPRIN ein transientes Silencing von maximal 6 Tagen. Die Lentivirus-vermittelte bzw. über das pTETON-System induzierte Abnahme der EMMPRIN Expression über shRNA war hingegen konstitutiv also dauerhaft über mindestens 4 Wochen induzier- und nachweisbar.

3.5 Funktionelle Veränderungen in den Harnblasenkarzinomzellen in vitro in Abhängigkeit der EMMPRIN-Expression

Bisher konnte gezeigt werden, dass die EMMPRIN-Expression durch verschiedene Methoden in vitro gehemmt werden konnte und daraus eine verringerte Produktion des EMMPRIN-Proteins in der Zellkultur resultierte. Die funktionellen Veränderungen der Zellkultur hinsichtlich Zellwachstum, Metabolismus, Apoptose, Proliferation und Migration in Abhängigkeit der EMMPRIN-Expression sind Gegenstand der folgenden Betrachtungen.

3.5.1 Verändertes Zellwachstum bei pTETON-vermitteltem EMMPRIN-Silencing

Um den Einfluss von EMMPRIN auf das Zellwachstum, welches sich aus der Kombination u.a. der Parameter Proliferation, Proteinsynthese und Apoptose erschließt, zu charakterisieren, haben wir über einen Zeitraum von vier Tagen das Wachstumsverhalten der Zellkulturen beobachtet. Jeweils am Anfangs- (d0) und am Endpunkt (d4) wurde die absolute Zellzahl in der Zellkulturschale mittels einer Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Diese Untersuchungen wurden in Zellen durchgeführt, welche über das Tetrazyklin-induzierbare konditionale Expressionssystem eine Inhibition der EMMPRIN-Expression zeigten. Verwendet wurden T 24, welche mit dem pTETON-Vektor und der damit induzierbaren sh-RNA stabil transfiziert waren. An Tag 0 wurden 3×10^5 Zellen der jeweiligen sh-Konstrukte und der LacZ-Kontrolle in je zwei Vertiefungen einer 24-well Platte ausgesät. Der eine Teil wurde durch Zugabe von Doxycyclin stimuliert und sollte dadurch eine Inhibition der EMMPRIN-Expression erfahren. Der andere Teil der Zellkultur diente als Negativ-Kontrolle ohne Stimulation und sollte sich im normalen Zellzyklus teilen. Nach insgesamt vier Tagen wurden die Zellen geerntet und wiederum die absolute Zellzahl bestimmt. Die folgenden Ergebnisse, welche in den Diagramme 3 a) – d) dargestellt sind, ließen sich in drei Versuchsreihen bestätigen.

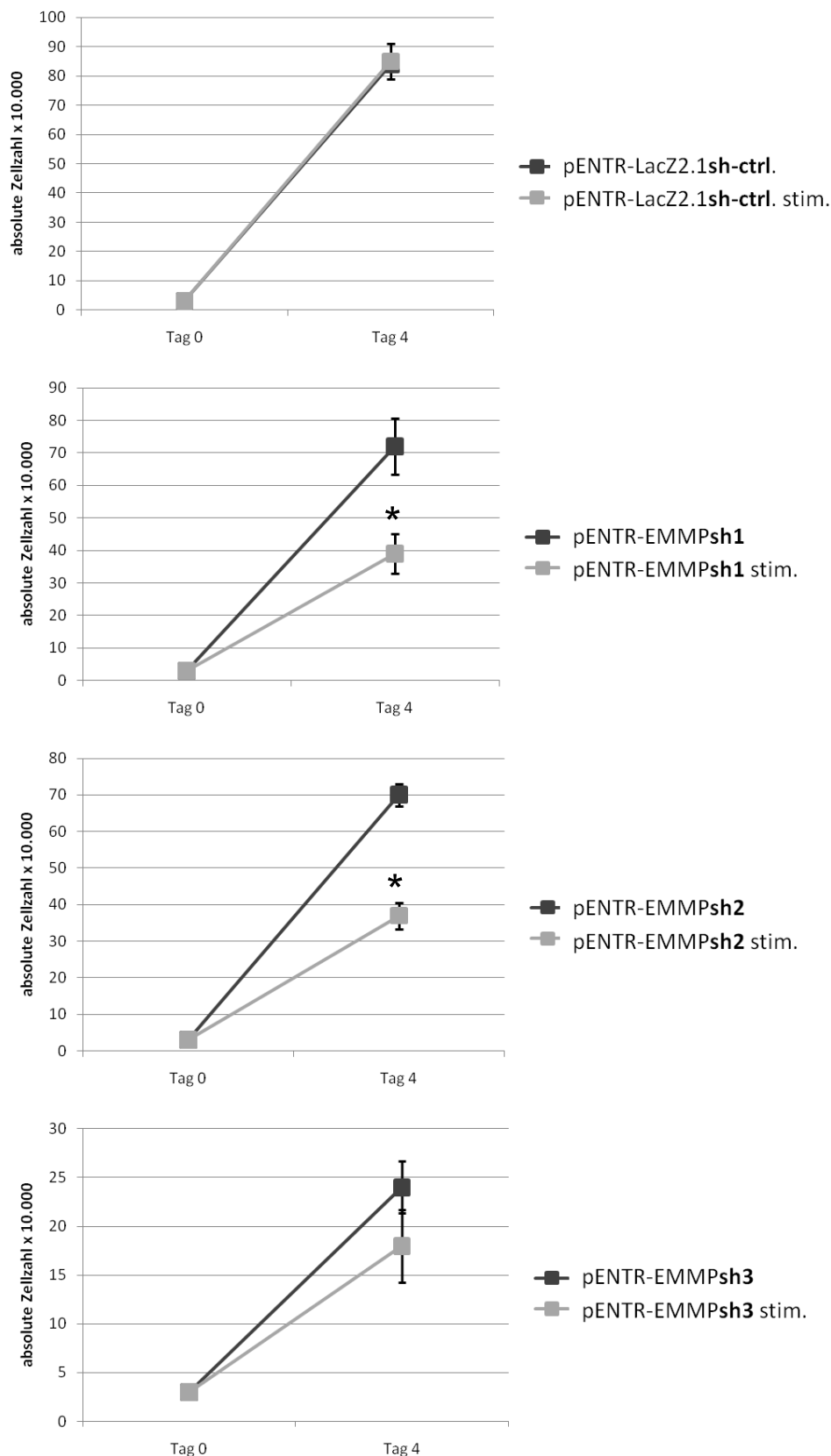


Diagramme 3 a) – d): EMMPRIN-Silencing hat Einfluss auf die Zellteilung. In T24 wurde mithilfe des konditionalen Expressionssystems TetON durch Stimulation (stim.) mit Doxycyclin eine stabile Inhibition der EMMPRIN-Expression induziert. T24-Zellen, deren EMMPRIN-Expression durch den aktiven pTETON-Vektor (= stim.) unterdrückt wurde, zeigten eine deutliche Reduktion der Proliferation. * statistisch signifikant nach Student'schen t-Test $p < 0.05$.

Während sich beim LacZ-Kontrollkonstrukt kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl zwischen an- und ausgeschaltetem pTETON-Vektor nachweisen ließ, zeigten das EMMPrin1-, das sh2- und das sh3-Konstrukt bei der durch Stimulation induzierten Inhibition der EMMPrin-Expression deutlich geringere Zellzahlen nach einer Kulturzeit von vier Tagen. Prozentual war die Zellteilung bei Inhibition der EMMPrin-Expression durch sh1 und sh2 auf 50% und bei sh3 auf durchschnittlich 70% reduziert, wenn man die Zellteilungsrate der Vergleichszellen mit 100 % gleichsetzte.

3.5.2 Einfluss des EMMPrin-Silencing auf Zellmetabolismus, Apoptose und Proliferation

3.5.2.1 EMMPrin-abhängiger Zellmetabolismus im XTT-Test

Wir wollten wissen, ob sich der Stoffwechsel der Harnblasenkarzinomzellen in Abhängigkeit von der EMMPrin-Expression der Zellen ändert. Eine Möglichkeit dies zu zeigen war der von uns gewählte XTT-Zellvitalitätstest, über welchen die Zellviabilität (=Metabolisierungsrate) der Zellen bestimmt wurde. In diesem Assay wurde das Tetrazoliumsalz XTT von den aktiven Dehydrogenasen der Mitochondrien der lebenden Zellen in Anwesenheit eines elektronenbindenden Agens in wasserlösliches und im ELISA-Reader wegen des Farbumschlages messbares Formazan umgesetzt. Somit konnte man Informationen über den jeweiligen Metabolismus der Zellen gewinnen.

Wir wollten den Stoffwechsel von Harnblasenkarzinomzellen mit normaler EMMPrin-Expression mit dem von Zellen mit durch RNA-Interferenz (RNAi) reduzierter EMMPrin-Expression vergleichen. Dafür haben wir in RT112, T24, HT1376, 647V und 253J, welche stabil über ein Lentivirus mit der sh-RNA gegen EMMPrin transduziert waren, den XTT-Test gemäß Protokoll durchgeführt (s. Material- und Methodenteil 2.5.3.1). Ein Effekt der veränderten EMMPrin-Expression auf die Zellvitalität konnte nachgewiesen werden, jedoch reagierten nicht alle Zellen. Dass auch die unterschiedliche Effektivität der Transduktion mit der lentiviralen shRNA in verschiedenen Zelllinien einen Einfluss auf die Ergebnisse im Metabolismus-Assay hat, wird im Verlauf noch diskutiert werden (s. 4.4.2). Es zeigten sich folgende Ergebnisse hinsichtlich des Zellmetabolismus in Abhängigkeit von der EMMPrin-Expression in den Harnblasenkarzinomzellen (Diagramm 4).

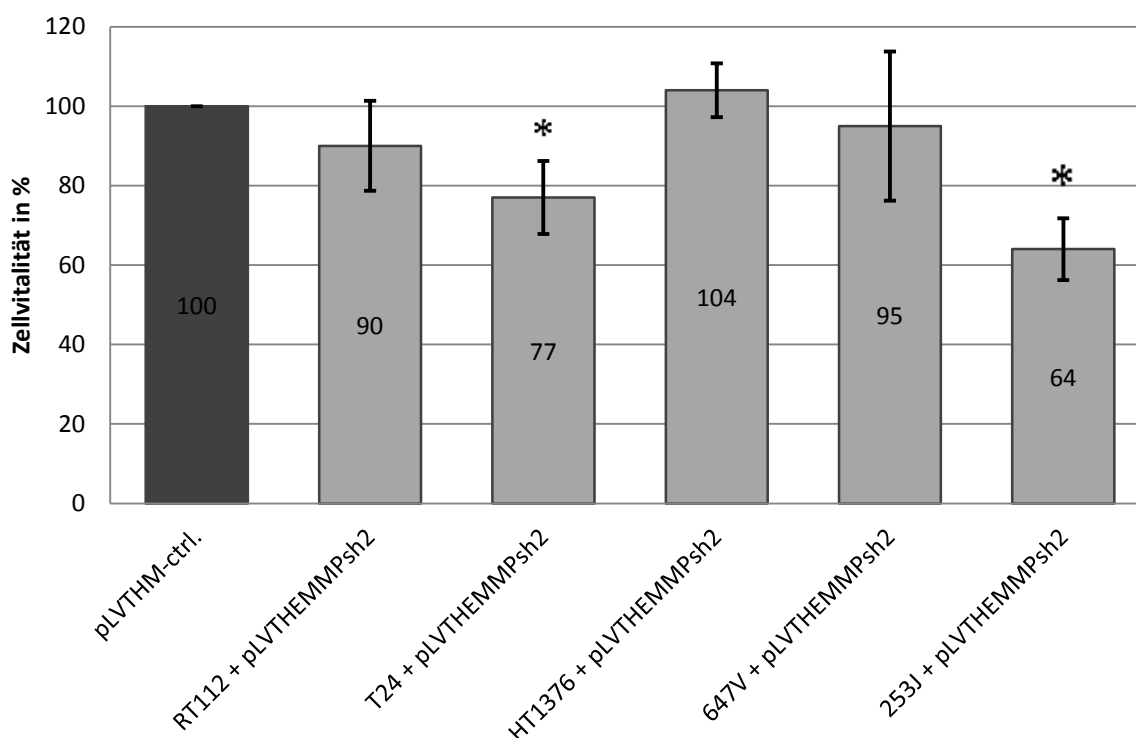


Diagramm 4: Mittels Lentivirus mit shRNA gegen EMMPRIN transduzierte RT112, T24, HT1376, 647V und 253J im XTT-Zellvitalitäts-Assay. Stoffwechselaktive und proliferierende Zellen hatten eine gesteigerte Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen und setzten den Farbstoff XTT vermehrt um. Im ELISA-Reader wurde die Extinktion gemessen, welche direkt proportional zur Zahl der stoffwechselaktiven Zellen war. Die Versuchsreihe wurde dreifach wiederholt. * statistisch signifikant im Student'schen t-Test $p < 0.05$.

Die Zelllinien 253J und T24 zeigten eine deutliche Reduktion der Dehydrogenase-Aktivität. Bei den anderen Zelllinien konnte kein signifikant eindeutiger Einfluss der reduzierten EMMPRIN-Expression auf die unterschiedlichen Harnblasenkarzinomzelllinien hinsichtlich ihres Metabolismus in der Umsetzung des Salzes gezeigt werden.

3.5.2.2 Apoptose der Zellen im Caspase-Assay

Desweiteren stellten wir uns die Frage, ob eine veränderte EMMPRIN-Expression Einfluss auf Apoptose-Induktion der Zellen hat. Innerhalb des programmierten Zelltodes spielen Caspasen eine entscheidende Rolle und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 konnte in einem enzymatischen Caspase-Assay gemessen werden (s. Material- und Methodenteil).

In RT112-Harnblasenkarzinomzellen wurde durch die si-Oligonukleotide EMMPsi1, EMMPsi2 und EMMPsi3 die EMMPRIN-Expression reduziert und anschließend das Apoptose-Verhalten in Abhängigkeit von ihrem EMMPRIN-Expressionsniveau untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte Aktivität der Caspasen 3 und 7 bei den RT112-Zellen, deren EMMPRIN-Expression durch die transiente

Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden inhibiert wurde. Das Diagramm 5 zeigt eine 5-9 fache Steigerung der Caspase-Aktivität bei Zellen, welche ein EMMPRIN-Silencing erfahren haben.

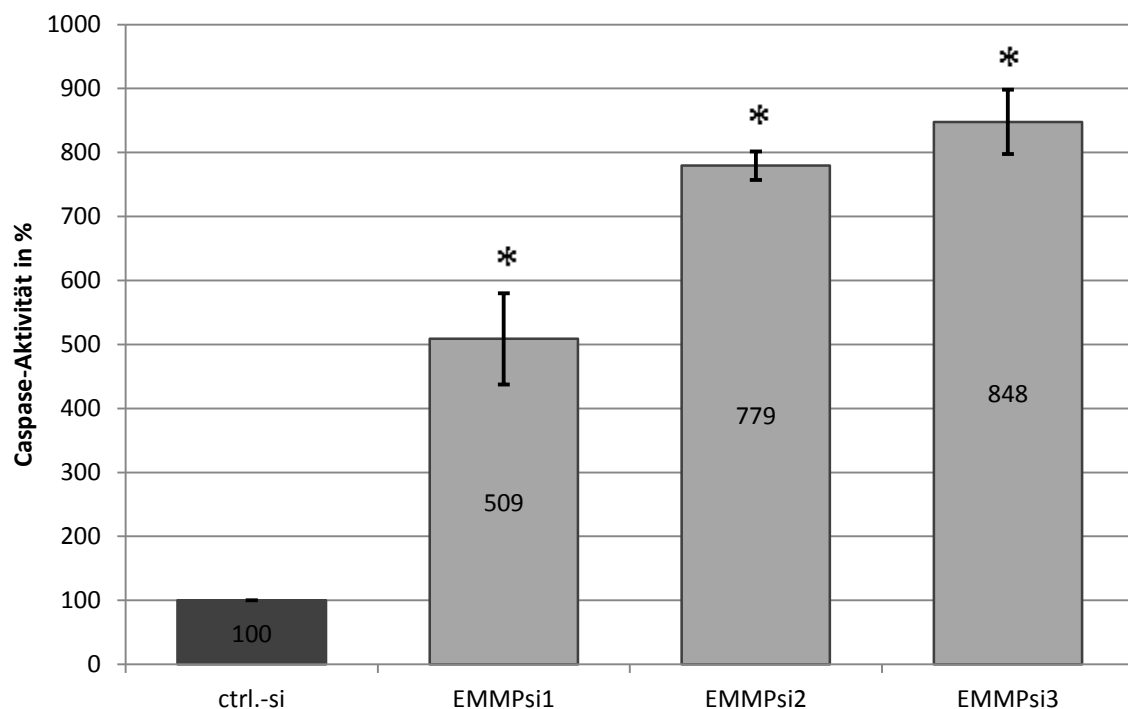


Diagramm 5: Erhöhte Caspase-Aktivität in RT112, deren EMMPRIN-Expression durch si-Oligonukleotide inhibiert wird. Nach Transfektion der RT112 mit den siOligonukleotid-Konstrukten EMMPsi1, EMMPsi2 und EMMPsi3 zeigten die Harnblasenkarzinomzellen aufgrund ihrer erniedrigten EMMPRIN-Expression eine erhöhte Bereitschaft zur Apoptose im Vergleich zur Kontrolle ctrl.-si. Die Versuchsreihe wurde dreifach wiederholt. * statistisch signifikant im Student'schen t-Test bei $p < 0.05$.

In einem weiteren Schritt wurde dieser Apoptose-Assay zur Untersuchung der Caspase-Aktivität auch in Harnblasenkarzinomzellen durchgeführt, deren EMMPRIN-Expression über die Lentivirus-vermittelte shRNA-Transduktion reduziert war. Dafür haben wir RT112, T24, HT1376, 647V und 253J-Harnblasenkarzinomzellen, deren EMMPRIN-Expression durch pLVTHMEMMPsh2 nachweislich (im Westernblot) reduziert war (s. 3.2.2.2) im Caspase-Assay untersucht und mit den entsprechenden Kontrollzellen verglichen, die auf Proteinebene über den Lentivirus mit pLVTHM keine Veränderung im EMMPRIN-Expressionsniveau hatten.

Über die durch Virusinfektion vermittelte Transduktion der Zellen mit der shRNA ließ sich nicht in allen Zelllinien eine signifikant erhöhte Aktivität der Caspasen im Vergleich zu den Kontrollzellen mit dem leeren Kontrollplasmid pLVTHM-ctrl. nachweisen (s. Diagramm 6).

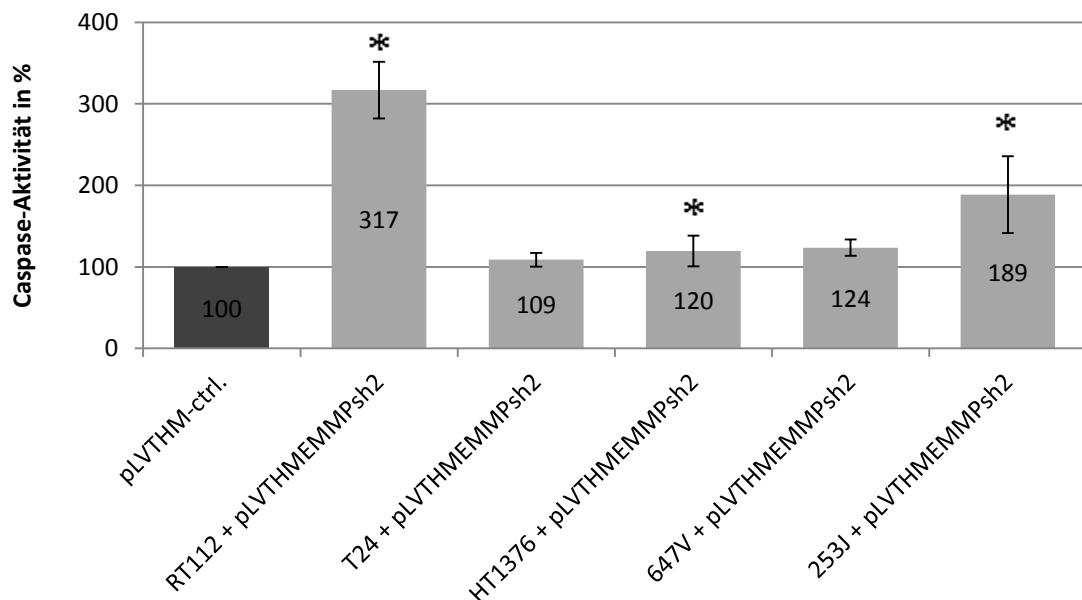


Diagramm 6: Caspase-Aktivität in Abhängigkeit von der EMMPRIN-Expression. RT112, T24, HT1376, 647V und 253J, welche nach Transduktion mit pLVTHMEMMPSH2 ein verändertes EMMPRIN-Expressionsniveau zeigten wurden hinsichtlich ihrer Caspase-Aktivität untersucht. Als Kontrolle dienten Zellen mit pLVTHM-ctrl. Alle Assays wurden dreimal wiederholt. * statistisch signifikant im Student'schen t-Test bei $p < 0.05$.

RT112, welche auch eine gute Transfektionsrate von 60% zeigten (s. 3.4.2.2) boten eine signifikant erhöhte Caspasen-Aktivität bei erniedrigtem EMMPRIN-Expressionslevel. 253J, welche zu 50% erfolgreich mit der shRNA transfiziert worden waren, zeigten eine Tendenz zur EMMPRIN-abhängigen Steigerung der Caspasen-Aktivität. In T24, HT1376 und 647V fanden wir keine signifikanten Ergebnisse hinsichtlich der veränderten Caspasen-Aktivität. Diese Differenzen zwischen den dargestellten Zelllinien müssen anschließend noch diskutiert werden.

Trotzdem weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Zellen, deren EMMPRIN-Expression künstlich inhibiert wird, tendenziell eine verstärkte Aktivität der Caspasen besitzen.

3.5.2.3 Einfluss von EMMPRIN auf Zell-Proliferation

Um zu evaluieren, ob die EMMPRIN-Expression Einfluss auf die Zell-Proliferation hat, führten wir einen BrdU-Assay durch. Dieser Assay beruht auf folgenden Prinzipien: Vitale Zellen synthetisieren für ihre Proliferation ständig DNA. Anstelle der in normaler DNA vorzufindenden Pyrimidin-Base Thymidin inkorporieren die Zellen in vitro das Analogon **Bromodesoxyuridin** (BrdU) in die DNA. Dies findet während der S-Phase des Zellzyklus statt. Über einen gegen BrdU gerichteten fluoreszenzgekoppelten Antikörper konnte somit die Proliferationsrate der Zellen in

in vitro bestimmt werden. Zusätzlich wurden die Zellen mit 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) gefärbt, welches an doppelsträngige DNA bindet.

Es wurden in der FACS-Auswertung die Zellpopulationen der vitalen proliferierenden Zellen in der S-Phase verglichen. Dies wurde als erstes in RT112-Harnblasenkarzinomzelllinien durchgeführt, in welchen zuvor durch transiente Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden ein reduziertes EMMPRIN-Expressionsniveau induziert wurde. Als Vergleich diente wieder das siRNA-Oligonukleotid-Konstrukt ctrl.-si ohne Wirkung auf die Expression von EMMPRIN. Folgende Ergebnisse (Diagramm 7) lieferte der Vergleich der Proliferationsraten derjenigen Zellen, welche mithilfe der siRNA-Oligonukleotide eine Inhibition des EMMPRIN-Expressionslevels erfuhren.

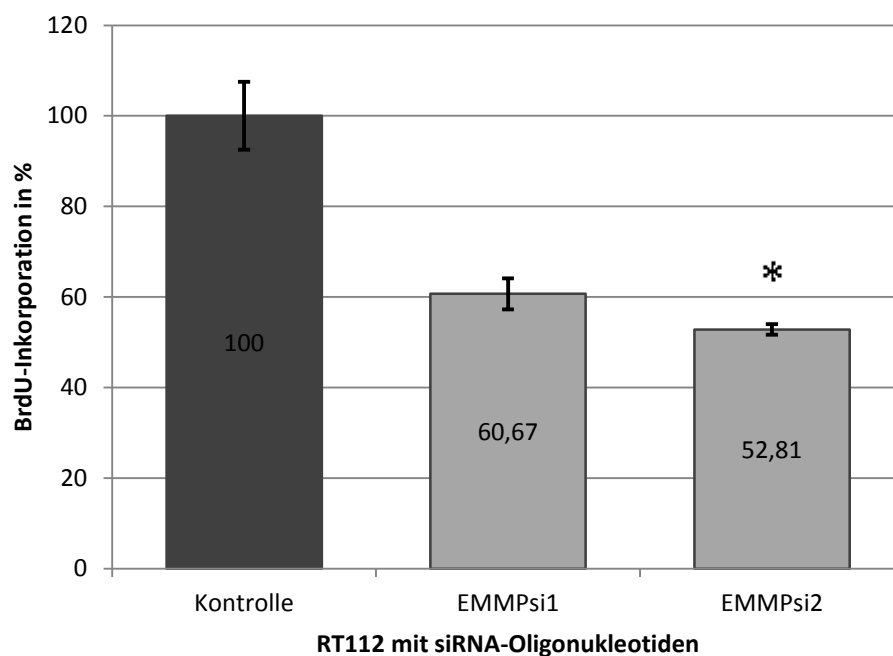


Diagramm 7: BrdU-Inkorporation bzw. Proliferationsraten in % von RT112, deren EMMPRIN-Expression durch transiente Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden herunterreguliert war. Die entsprechenden Zellkulturen wurden über 1 h bei 37° C mit BrdU gelabelt und anschließend nach Färbung mit einem Fluorochrom konjugierten anti-BrdU Antikörper und Fixation im FACS analysiert. Die prozentuale BrdU-Inkorporation kann als Maß für die Proliferation der Zellen in diesem entsprechenden Zeitraum von 1 h angesehen werden. Alle Assays wurden dreimal wiederholt. * statistisch signifikant im Student'schen t-Test bei $p < 0.05$.

Sowohl das hier in den RT112-Zellen verwendete EMMPsi1- als auch das EMMPsi2-Konstrukt konnten durch eine Reduktion der EMMPRIN-Expression die Proliferation der Zellen um 40% bzw. 48% senken.

Anschließend wurde die Proliferationsrate in Zellen analysiert, die über das lentivirale Vektorsystem mit dem Plasmid pLVTHMEMMPsh2 zum EMMPRIN-Silencing transduziert waren. Die FACS-Einstellungen wurden nun so vorgenommen, dass auf

der x-Achse im Laserkanal FL1-H die Zellen hinsichtlich GFP sortiert und auf der y-Achse weiterhin mit FL4-H die BrdU-Inkorporation der Zellen beurteilt werden konnten. Die GFP-positiven Zellen wurden hinsichtlich ihrer BrdU-Inkorporation von den GFP-negativen Zellen unterschieden, denn nur GFP-positive Zellen waren erfolgreich mittels des Lentivirus mit der shRNA gegen EMMPRIN transduziert. Da transduzierte Zellen GFP-positiv waren, stellten die GFP-positiven Zellen im FACS diejenige Population dar, welche stabil mit der sh-RNA transduziert war und ein EMMPRIN-Silencing erfahren hat.

Exemplarisch sind hier die Ergebnisse der Messung an RT112-Harnblasenkarzinomzellen dargestellt. Ausgewertet wurden in diesem Fall (Abbildung 22) die 85% GFP-positiven Zellen, d.h. diejenigen Zellen, deren EMMPRIN-Level durch die si-RNA herunterreguliert war, hinsichtlich ihrer Integration von BrdU in die DNA.

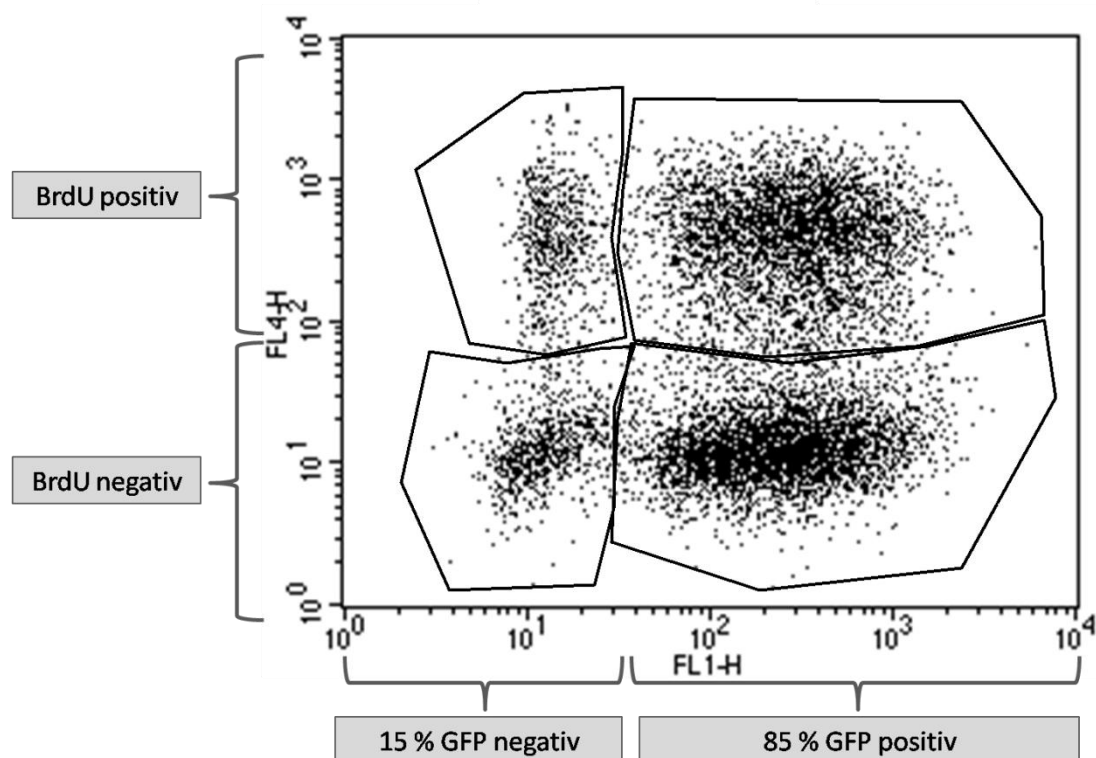


Abbildung 22: FACS-Messung von RT112+plVTHM hinsichtlich GFP-Fluoreszenz (x-Achse = FL1-H) und Analyse von APC-konjugiertem Antikörper gegen BrdU, welches von den proliferierenden Zellen in die DNA integriert wurde (y-Achse = FL4-H).

In Anlehnung an das hier abgebildete Ergebnis der Messung an RT112 wurden auch die weiteren Harnblasenkarzinomzelllinien analysiert. Die Zelllinien RT112, T24, HT1376, 647V und 253J zeigen dabei folgende Werte (Diagramm 8) für die BrdU-Inkorporation in Abhängigkeit ihrer EMMPRIN-Expression.

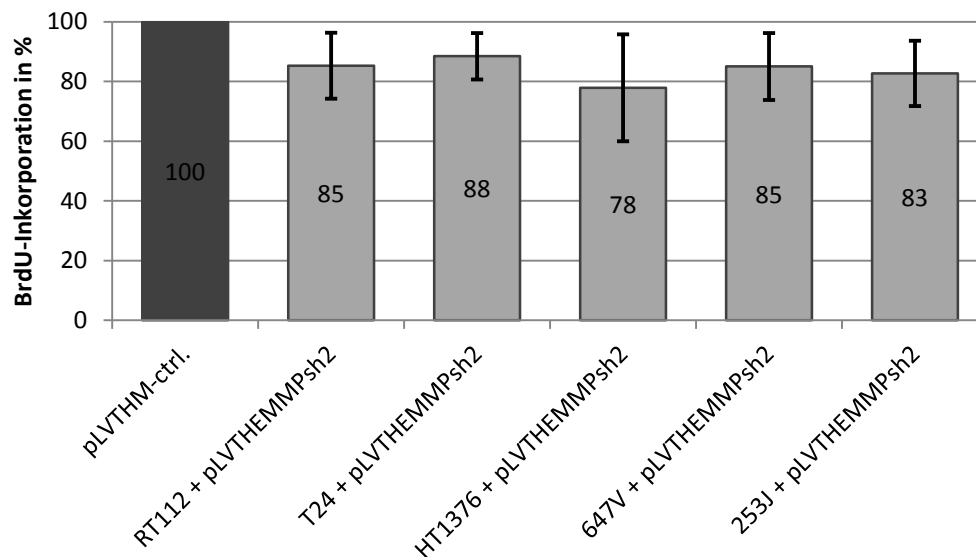


Diagramm 8: BrdU-Inkorporation bzw. Proliferationsraten in % von RT112, T24, HT1376, 647V und 253J, deren EMMPRIN-Expression durch Lentivirus-transduzierte shRNA herunterreguliert war. Die entsprechenden Zellkulturen wurden über 1 h bei 37° C mit BrdU gelabelt und anschließend nach Färbung mit einem Fluorochrom konjugierten anti-BrdU Antikörper und Fixation im FACS analysiert. Die prozentuale BrdU-Inkorporation konnte als Maß für die Proliferation der Zellen in diesem entsprechenden Zeitraum von 1 h angesehen werden. * statistisch signifikant im Student'schen t-Test bei $p < 0.05$.

Es ergab sich jeweils eine Reduktion der Proliferationsrate um 10-20% bei Zellen, in welchen über den Lentivirus das Plasmid pLVTHEMMPsh2 eine Expression von EMMPRIN deutlich reduziert, im Vergleich zur Kontrolle. Am deutlichsten wirkte sich die Inhibition der EMMPRIN-Expression auf die Proliferationsrate der HT1376-Zellen aus, welche um 22% weniger proliferierten. Die zusammengefassten Ergebnisse sind im Diagramm 8 dargestellt und zeigen, dass insgesamt zwar keine signifikanten Veränderungen in der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle bewirkt wurden, jedoch ein Trend hinsichtlich der Hemmung der Proliferation zu erkennen war, wenn man unterschiedliche EMMPRIN-Expressionslevel in den Zellen induzierte.

Auch mittels des konditionalen Expressionssystem, durch welches die EMMPRIN-Expression in den Zellen inhibiert werden kann, konnte eine zum Teil statistisch signifikante Reduktion der Proliferation in vitro induziert werden. Diagramm 9 gibt eine Übersicht über den Einfluss eines reduzierten EMMPRIN-Levels auf die Zellproliferation in RT112:

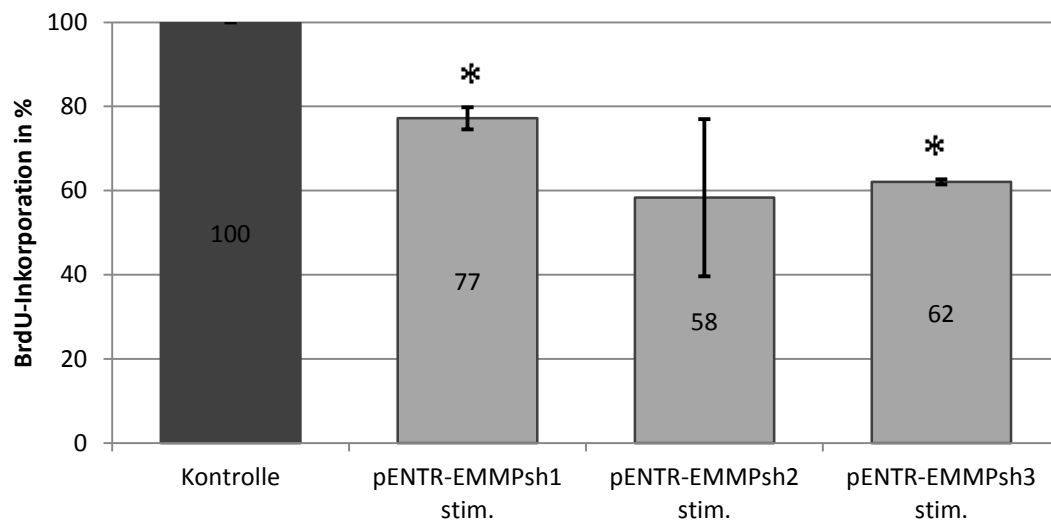


Diagramm 9: BrdU-Inkorporation bzw. Proliferationsraten in Abhängigkeit von der EMMPRIN-Expression: Durch das konditionale Expressionssystem TetOn wurde in RT112 mit shRNA die EMMPRIN-Expression stabil herunterreguliert. RT112-Zellen, deren EMMPRIN-Expression durch den aktiven pTETON-Vektor (= stim.) unterdrückt wurde, zeigten eine deutliche Reduktion der Proliferation. Die entsprechenden Zellkulturen wurden über 1 h bei 37° C mit BrdU gelabelt und anschließend nach Färbung mit einem Fluorochrom konjugierten anti-BrdU Antikörper und Fixation im FACS analysiert. Die prozentuale BrdU-Inkorporation in der S-Phase des Zellzyklus konnte als Maß für die Proliferation der Zellen in diesem entsprechenden Zeitraum von 1 h angesehen werden. * statistisch signifikant im Student'schen t-Test bei $p < 0.05$.

Zusammenfassend kann hinsichtlich der Proliferation der Harnblasenkarzinomzellen in vitro konstatiert werden, dass eine verminderte Expression von EMMPRIN in Abhängigkeit der analysierten Zelllinie zu einer reduzierten Proliferationsrate führte. Zwar zeigten nicht alle Methoden für die Expressionshemmung von EMMPRIN statistisch signifikante Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses auf die Zellproliferation, jedoch ließ sich ein klarer Trend erkennen.

3.5.3 Einfluss des EMMPRIN-Silencing auf das Migrationsverhalten der Zellen im Scratch-Assay

In einem weiteren Schritt innerhalb der Untersuchungen der funktionellen Veränderungen der Harnblasenkarzinomzellen in Abhängigkeit ihres EMMPRIN-Expressionsniveaus wollten wir das Migrationsverhalten der Zellen in vitro untersuchen. Dafür haben wir einen Scratch-Assay etabliert. Beobachtet wurde hierbei ein in einen gleichmäßig konfluenten Zellrasen gesetzter Schnitt (=Scratch), der von den Zellen durch Migration wieder geschlossen wurde. Harnblasenkarzinomzellen RT112 wurden transient mit den siRNA-Oligonukleotiden EMMPsi1, EMMPsi2, EMMPsi3 oder der Kontrolle ctrl.-si transfiziert.

Bei den untersuchten RT112 ergab sich ein verändertes Migrationsverhalten der Harnblasenkarzinomzellen, wenn die EMMPRIN-Expression durch direktes Einbringen der siRNA –Oligonukleotide über Transfektion herunterreguliert war, wie in Abbildung 23 dargestellt. Zum Zeitpunkt 0h wurde direkt nach dem Setzen des künstlichen Scratches mit einem Photo die Spaltbreite dokumentiert. Anschließend wurde im Abstand von 12h das Schließen des Spaltes dokumentiert.

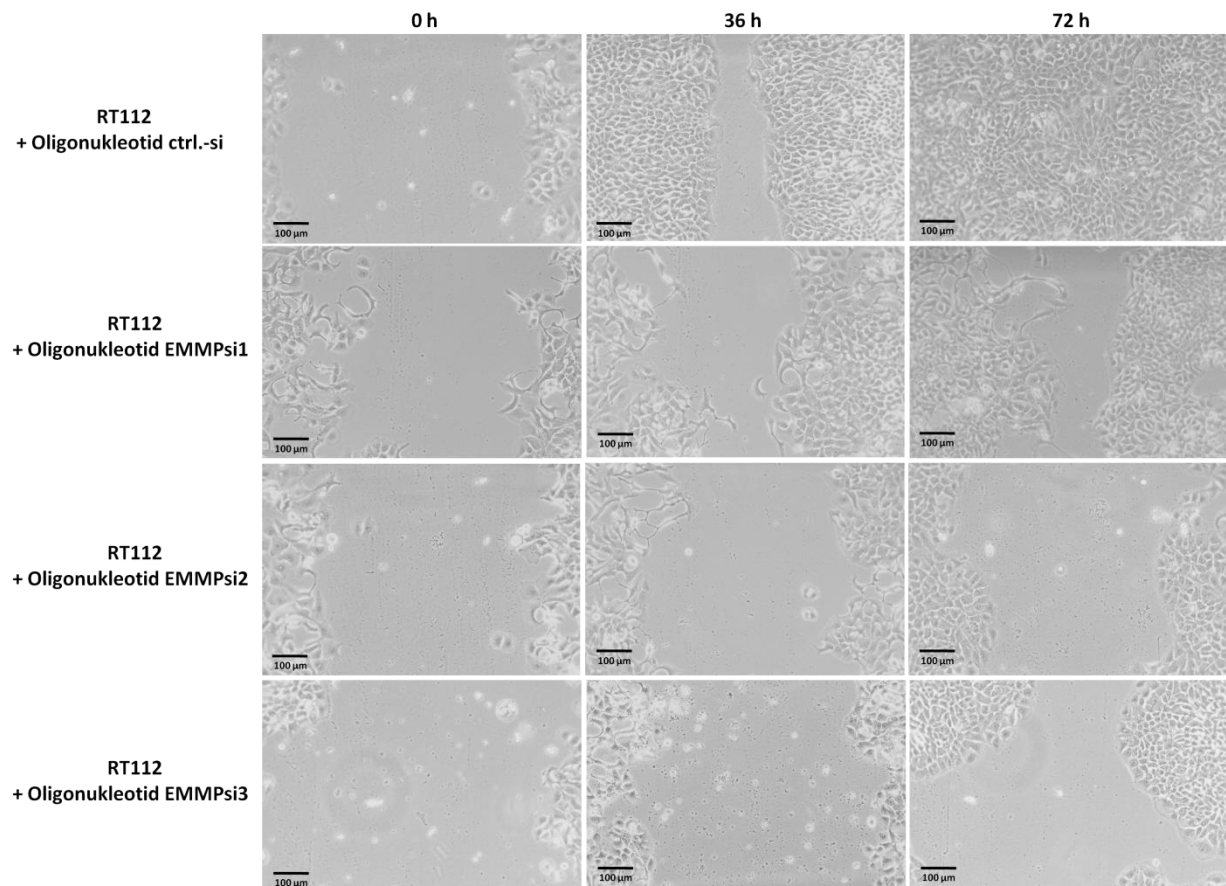
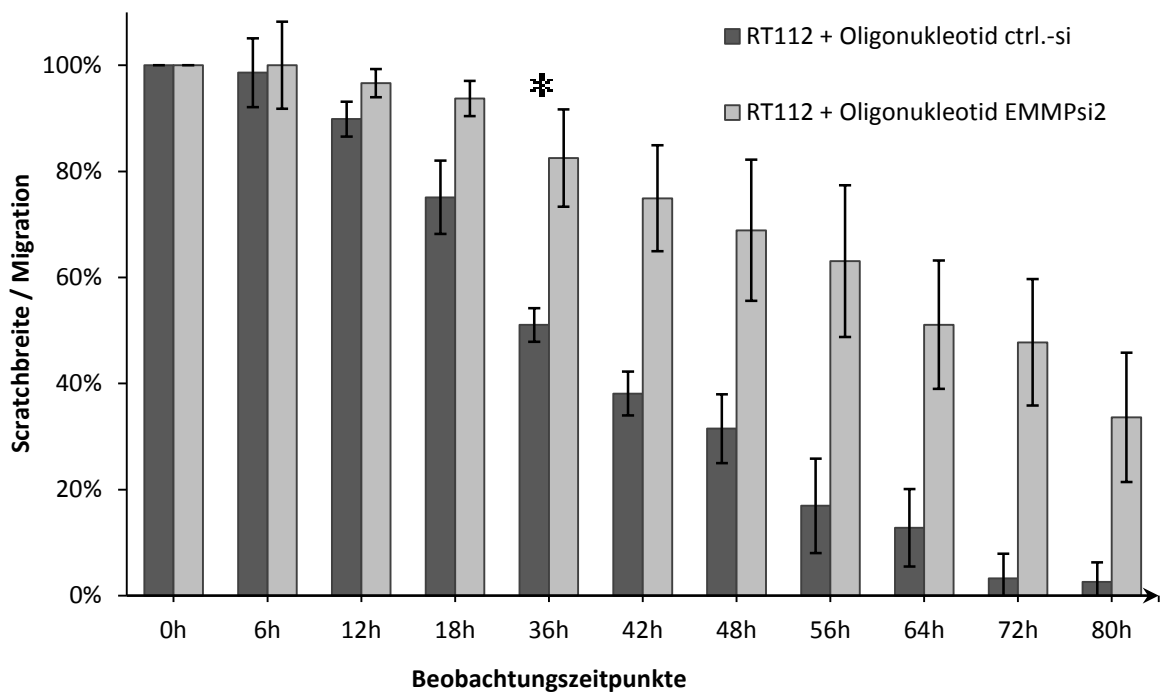
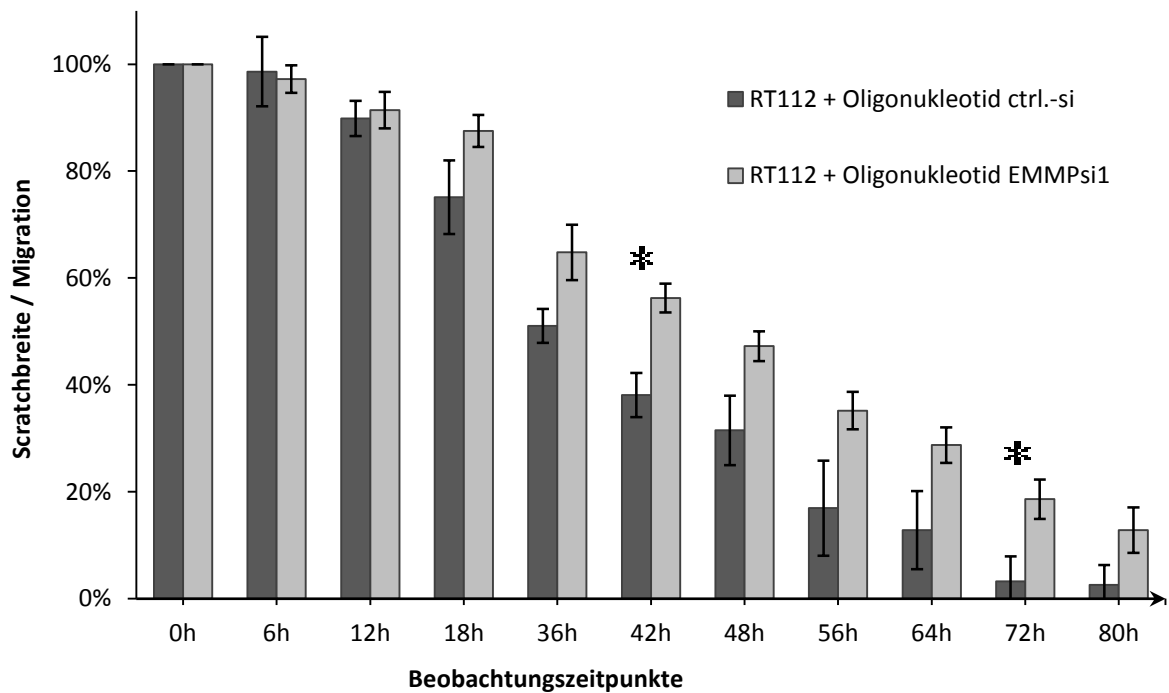


Abbildung 23: Migrationsverhalten von RT112 mit siRNA-Oligonukleotid-vermitteltem EMMPRIN-Silencing im Scratch-Assay. Die oberste Bildreihe zeigt die Kontrollzellen RT112 + Oligonukleotid ctrl.-si, die zweite bis vierte Reihe zeigen RT112 mit dem jeweiligen siRNA-Oligonukleotid-Konstrukt EMMPsi1-3 mit herabgesetzter EMMPRIN-Expression. Jeweils zum Zeitpunkt des frisch gesetzten Scratches (0h), nach 36h und 72h wurden repräsentative Stellen photographisch dokumentiert und ausgemessen bis der Scratch vollständig geschlossen war.

RT112, welche zur Kontrolle mit dem leeren siRNA-Oligonukleotidkonstrukt ctrl.-si transfiziert wurden, hatten nach spätestens 72h den künstlich gesetzten Scratch durch Migration vollständig geschlossen. Unter Einfluss der siRNA-Oligonukleotide EMMPsi1, EMMPsi2 und EMMPsi3 hatte sich der Scratch nur um 50 % geschlossen. Eine stärkere Inhibition der Migration durch die Konstrukte EMMPsi2 und EMMPsi3 im Vergleich zu EMMPsi1 deckte sich nicht mit den Ergebnissen der deutlicher reduzierten EMMPRIN-Expression im Westernblot mit diesen Konstrukten (vgl. 3.4.1). In den drei Diagramme 10 a) – c) ist der zeitliche Verlauf der EMMPRIN-

abhängigen Migration der Harnblasenkarzinomzellen dargestellt. An drei verschiedenen Punkten wurde das Schließen des Scratches über einen Zeitraum von 80h im Abstand von 12h gemessen. Über den gesamten Zeitraum von 80h schlossen die Kontrollzellen mit normalem EMMPRIN-Expressionsniveau den Scratch zügiger als die Zellen mit reduzierter EMMPRIN-Expression. Endpunkt der Dokumentation und der Messungen war, wenn der Spalt in Kontroll- oder EMMPRIN-Silencing-Zelllinien vollständig geschlossen war.



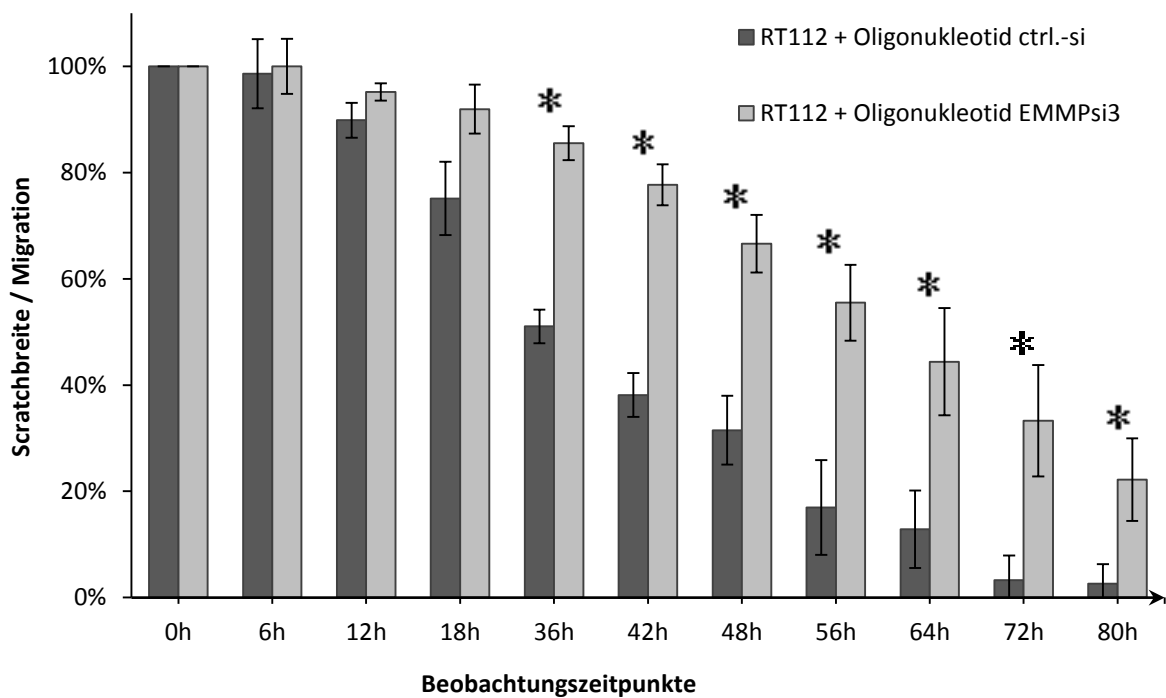


Diagramme 10 a) - c): Migrationsverhalten von RT112 mit siRNA-Oligonukleotid-vermitteltem EMMPRIN-Silencing im Scratch-Assay. In Erweiterung zu Abbildung ist hier über den gesamte Beobachtungszeitraum von 96h in unterschiedlich langen Intervallen das Migrationsverhalten von RT112 mit den verschiedenen siRNA-Oligonukleotidkonstrukten bzw. der zeitliche Ablauf des Schließen des Scratches durch die Zellmigration aufgetragen. * statistisch signifikant im Student'schen t-Test bei $P < 0,05$.

Im Anschluss wurden wiederum Harnblasenkarzinomzellen untersucht, deren EMMPRIN-Expression durch Lentivirus-vermittelte shRNA-Transduktion herunterreguliert war. Verwendet wurden RT112- und T24-Harnblasenkarzinomzellen. Dokumentation und Auswertung erfolgte nach denselben Prinzipien wie vorher. Abbildung 24 und das Diagramm 11 zeigen, dass RT112-Zellen mit shRNA gegen EMMPRIN, welche über das lentivirale System in den Zellen exprimiert wurde (= RT112+pLVTHEMMPsh2), den künstlich gesetzten Scratch im konfluenten Zellmonolayer über den Zeitraum von 48 Stunden um bis zu 35 % langsamer schlossen als die Vergleichszellen RT112 + pLVTHM ctrl.

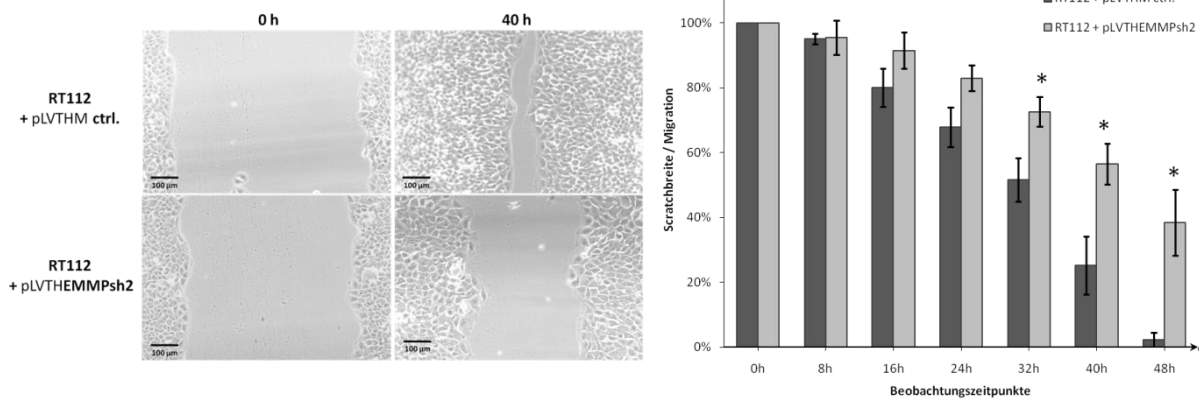


Abbildung 24 + Diagramm 11: Migrationsverhalten von RT112 mit Lentivirus-vermitteltem EMMPRIN-Silencing im Scratch-Assay. Die obere Bildreihe zeigt die Kontrollzellen RT112 + pLVTHM ctrl., die unteren Reihe zeigt RT112 + pLVTHEMMPsh2 mit geringerer EMMPRIN-Expression. Jeweils zum Zeitpunkt des frisch gesetzten Scratches (0h) und nach 40h wurde eine repräsentative Stelle photographisch dokumentiert. Im nebenstehenden Diagramm ist der gesamte Zeitraum über 48h im 8h-Intervall gegen die kontinuierliche Abnahme der prozentualen Scratchbreite und den Schluss des Scratches durch die Zellmigration aufgetragen. * statistisch signifikant im Student'schen t-Test bei $P < 0,05$.

Auch die zweite Zelllinie T24, welche hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens im Scratch-Assay beobachtet wurde, zeigte eine deutliche Hemmung der Migration bei den Zellen mit reduziertem EMMPRIN-Expressionslevel, welcher durch Lentivirus-vermittelte Transduktion von shRNA gegen EMMPRIN in die Zellen induziert wurde. Die Vergleichszellen mit normalem EMMPRIN-Expressionslevel (= T24 + pLVTHM ctrl.) schlossen den Scratch nach 40h vollständig, wohingegen die Zellkulturen mit herunterreguliertem EMMPRIN-Niveau (= T24 + pLVTHEMMPsh2) noch eine deutliche Dehiszenz der Zellfronten aufwiesen (Abbildung 25). Prozentual ergab sich ein Unterschied um bis zu 35 %. Die kompletten Daten sind im Diagramm 12 zusammengestellt.

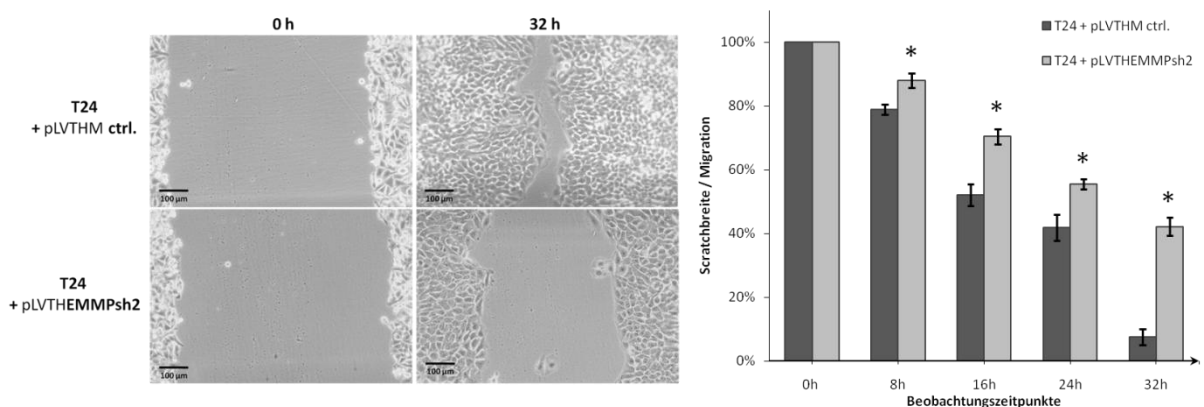


Abbildung 25 und Diagramm 12: Migrationsverhalten von T24 mit Lentivirus-vermitteltem EMMPRIN-Silencing im Scratch-Assay. Die obere Bildreihe zeigt die Kontrollzellen T24 + pLVTHM ctrl., die unteren Reihe zeigt T24 + pLVTHEMMPsh2 mit geringerer EMMPRIN-Expression. Jeweils zum Zeitpunkt des frisch gesetzten Scratches (0h) und nach 32h wurde eine repräsentative Stelle photographisch dokumentiert. Daneben in Diagramm 10 ist der gesamte Zeitraum über 32h im 8h-Intervall gegen die kontinuierliche Abnahme der prozentualen Scratchbreite und den Schluss des

Scratches durch die Zellmigration aufgetragen. * statistisch signifikant im Student'schen t-Test bei $P < 0,05$.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass in unseren Untersuchungen EMMPRIN einen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Harnblasenkarzinomzelllinien in vitro hatte. Immer wenn die EMMPRIN-Expression künstlich durch RNA-Interferenz inhibiert wurde, dann zeigten die Harnblasenkarzinomzellen die Tendenz weniger stark zu migrieren.

4 Diskussion

Zahlreiche Forschungsgruppen haben sich mit EMMPRIN als multifunktionalem Oberflächenprotein in der Tumorprogression beschäftigt. Trotz der nachgewiesenen Expression von EMMPRIN in diversen Tumorentitäten und der postulierten Korrelation zwischen EMMPRIN-Expressionslevel und Tumorprogression, ist der Wirkmechanismus von EMMPRIN auf molekularer und zellulärer Ebene noch nicht hinreichend geklärt. Insbesondere im Harnblasenkarzinom erscheinen die Datenlage und das Wissen um die Grundlagen noch lückenhaft. Daher war Ziel dieser Forschungsarbeit die Rolle von EMMPRIN in der Tumorprogression des humanen Harnblasenkarzinoms anhand von in-vitro Studien näher zu charakterisieren und Ausblicke auf EMMPRIN als neues therapeutisches Zielmolekül zu geben.

4.1 Expression von EMMPRIN in Harnblasenkarzinomzelllinien

Wir untersuchten 9 humane Harnblasenkarzinomzelllinien, welche sich in ihrer Tumorigenität und ihrem metastatischen Potential in vivo unterscheiden, in einer RT-PCR Analyse und anschließend im Western Blot hinsichtlich ihrer EMMPRIN-Expression. Alle untersuchten Zelllinien zeigten in der RT-PCR und im Westernblot eine Bande für EMMPRIN bei 380bp bzw. 35-65kDa. Eine 2010 von Xue et al. veröffentlichte Arbeit untersuchte ebenfalls die EMMPRIN-Expression in humanen Harnblasenkarzinomzelllinien in vitro. In den fünf untersuchten Zelllinien zeigte sich auf Proteinebene im Westernblot in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen ein deutliches Signal für EMMPRIN im Vergleich zu gesunden Urothelzellen (Xue, Lu et al. 2010). In Übereinstimmung mit bisherigen Arbeiten an EMMPRIN in anderen Tumorentitäten (Reimers, Zafrakas et al. 2004; Riethdorf, Reimers et al. 2006) wurde von uns an Harnblasenkarzinomzellen gezeigt, dass EMMPRIN bei 37kDa, welches dem theoretischen Molekulargewicht von EMMPRIN entspricht, und in einem Bereich von 45-65kDa detektiert wird. Dieses Bandenmuster entspricht wahrscheinlich den von den Arbeitsgruppen um Tang und Riethdorf charakterisierten posttranslationalen Glykolisierungsmodifikationen (Tang, Chang et al. 2004; Tang and Hemler 2004; Riethdorf, Reimers et al. 2006). Glykosyliertes EMMPRIN wurde als biologisch-aktive Form beschrieben, da nur diese glykosylierte EMMPRIN-Form in der Plasmamembran homophile Oligomere bildet und die MMP-Produktion stimuliert (Tang and Hemler 2004). Offensichtlich ist also auch im Harnblasenkarzinom in den von uns untersuchten Zellen das EMMPRIN-Protein posttranslational glykosyliert. Malignes Verhalten von Zellen ist mit hohem Glykosylierungsgrad von

Glykoproteinen vergesellschaftet (Dennis, Granovsky et al. 1999) und so scheint für die Tumorprogression maßgeblich die glykosylierte EMMPRIN-Variante über die MMP-Induktion verantwortlich zu sein, so dass wir davon ausgehen können, dass EMMPRIN in Urothelkarzinom-Zellen in seiner beschriebenen bioaktiven Form vorliegt.

4.2 Prognostische Bedeutung der EMMPRIN-Expression im humanen Harnblasenkarzinom

Die in unserer Studie durchgeführten immunhistologischen Färbungen an Gewebsschnitten von Harnblasenkarzinomen zeigten in allen Tumorstadien und Differenzierungsgraden eine EMMPRIN-Expression. Unsere Beobachtung, dass EMMPRIN im Zytoplasma zu finden ist, bestätigt Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (Muraoka, Nabeshima et al. 1993; Als, Dyrskjot et al. 2007; Han, He et al. 2010; Xue, Lu et al. 2010).

1993 versuchten Muraoka und Kollegen EMMPRIN, damals noch unter dem Namen *tumor collagenase stimulatory factor* (TCSF) geführt, als Tumormarker im Urothelkarzinom zu etablieren (Muraoka, Nabeshima et al. 1993). Neuere Studien zielen mehr auf die Untersuchung von EMMPRIN als prognostischen Marker ab (Als, Dyrskjot et al. 2007). In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. A. Hartmann in Erlangen haben wir daher die Expression von EMMPRIN auf einem TMA mit primärem Tumorgewebe von 198 Patienten (pTa-pT4) untersucht, wobei vorläufige Ergebnisse eine Korrelation zwischen EMMPRIN-Positivität, Tumorstadien und Überlebensraten zeigen. Mit einem Follow up von Patienten über mehr als fünf Jahre nach Erstdiagnose und immunhistochemischem Nachweis der EMMPRIN-Expression in den entnommenen Harnblasenkarzinomproben sowie einer insgesamt großen Fallzahl bietet der von uns verwendete TMA im Rahmen des Deutschen Forschungsverbundes Blasenkarzinom e.V. Vorteile im Vergleich zu bisher publizierten Daten anderer Forschungsgruppen. In der bisherigen Auswertung waren Tendenzen beobachtet worden, jedoch fehlt aufgrund der noch nicht abgeschlossenen Datenlage der Nachweis einer statistischen Signifikanz z.B. in einer Kaplan-Meier- oder Cox-Regressions-Analyse. Auch die Forschungsgruppe um Wittschieber hält zum Thema EMMPRIN im Harnblasenkarzinom fest, dass die Langzeitdaten insbesondere zu Rezidivraten oder progressionsfreiem Patientenüberleben im Zusammenhang mit einer erhöhten EMMPRIN-Expression im high-grade Urothelkarzinom noch fehlen (Wittschieber, Stenzinger et al. 2011). In

einer jüngst erschienenen Publikation zeigen Afonso et al. einen möglichen Zusammenhang zwischen EMMPRIN-Expression und Tumoransprechen. (Afonso, Longatto-Filho et al. 2011). Diese TMA-Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass die EMMPRIN-Expression im humanen Harnblasenkarzinom eine Rolle für das Tumorstadium, den Differenzierungsgrad, das Gesamtüberleben und die Wirksamkeit einer Therapie der Patienten spielen. Somit scheint eine weitere Charakterisierung von EMMPRIN als prediktiver und prognostischer Marker im humanen Harnblasenkarzinom in-vivo notwendig und sinnvoll.

4.3 EMMPRIN-Knockdown in Harnblasenkarzinomzelllinien mittels siRNA

Mit dem Ziel, EMMPRIN in seiner Funktionalität im Harnblasenkarzinom zu charakterisieren wurde die Technik der RNA-Interferenz mittels spezifischer siRNA gegen EMMPRIN. Abhängig vom Zelltyp, der Dauer und Effektivität des Knockdown und den geplanten funktionellen Assays etablierten wir drei Methoden der Expressionsmodulation von Genen mittels siRNA.

4.3.1 Transientes Silencing mit spezifischen siRNA-Oligonukleotiden

Wir haben an drei verschiedenen Zelllinien mittels transienter Transfektion von siRNA-Oligonukleotiden eine transiente Inhibition der EMMPRIN-Expression in einem Zeitraum von 2-5 Tagen nach Transfektion nachweisen können. Toxische Effekte der Transfektionsreagenzien konnten ausgeschlossen werden, da die Kontrollen denselben Transfektionsbedingungen ausgesetzt waren und unveränderte Gen-Expression von EMMPRIN zeigten. Somit ließen sich mit dieser Methode in einem begrenzten Zeitraum funktionelle Assays mit den Zellen durchführen. Die Arbeitsgruppe um Han et al. zeigte als Ergänzung zu unserer Arbeit, dass sich mit einer weiteren sogenannten doppelten Transfektion nach 3 Tagen der Effekt stabilisieren ließe und auch nach 10 Tagen keine Erholung der unterdrückten EMMPRIN-Expression stattfindet (Han, He et al. 2010). Wir haben in ähnlichen Experimenten hohe Toxizitäten durch die erneute Transfektion Zelllinien-abhängig beobachten können und verfolgten diese Strategie nicht weiter (Daten nicht gezeigt). In unserer Studie ließen sich ein maximaler Effekt mit EMMPSi1 und ein deutlicher Effekt mit EMMPSi2 jeweils in RT112-Zellen erzielen, was Daten aus Lungenkarzinom-Zellen bestätigen (Sidhu, Nawroth et al. 2010).

4.3.2 Stabiles Silencing mittels Lentivirus

Der Vorteil des von uns verwendeten lentiviralen Infektionssystems besteht darin, dass über Virus-Infektion der Zellen shRNA-Expressionsvektoren in die genomische DNA der Zelle integriert werden, durch welche eine ständige intrazelluläre Synthese der anti-EMMPRIN shRNA erfolgt. Ein dauerhaftes EMMPRIN-Silencing ist im Vergleich zur transienten Expressionshemmung mit siRNA-Oligonukleotiden möglich. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Infektionseffizienzen mit den Lentiviren auch in Abhängigkeit von den Zelllinien unterschiedlich sind und somit eine stabile Transduktion für die shRNA von der erfolgreichen Virusinfektion abhängig ist. In der FACS-Analyse ergab sich in unseren Studien eine Infektionseffizienz von über 85%. Verschiedene Arbeitsgruppen bestätigen solche Infektionsraten (Zucker, Hymowitz et al. 2001; Sidhu, Nawroth et al. 2010; Xue, Lu et al. 2010). Für weitergehende Studien könnten diese Zellen z.B. mittels FACS (Durchflusszytometrie) angereichert und in einer Reinkultur weiterverwendet werden. RT112 und T24 Zellen zeigten wie bei den siRNA-Oligonukleotiden erneut ein hervorragendes Ansprechen auf die RNA-Interferenz mit jeweils Expressionsreduktion um 60% bzw. 80%. Xue et al. konnten dosisabhängig für T24-Zellen in einem adenoviralen Infektionssystem eine Expressionshemmung für EMMPRIN von 80% erzielen und eine unspezifische Genexpressionshemmung mit entsprechenden Kontrollen ausschließen (Xue, Lu et al. 2010).

Interessanterweise zeigte sich in unserer Arbeit bei 647V unter lentiviralem Einfluss von pEMMPsh2 nur eine kaum erkennbare EMMPRIN-Expressionshemmung und bestätigt damit unsere Ergebnisse in dieser Zelllinie aus dem Gen-Silencing mittels siRNA-Oligonukleotiden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass eine Mutation im EMMPRIN-Genom eben genau an dem komplementären siRNA-Abschnitt die Ursache für ein mangelndes Silencing wäre. Denkbar wären jedoch auch Defekte im RNAi-Mechanismus, womit die Prozessierung der RNAi oder die Beladung des RISC-Komplexes gestört sein könnte.

4.3.3 Konditionales Silencing im pTETon-System

Für laufende Versuchsreihen mit Harnblasenkarzinomzellen, deren EMMPRIN-Expression gezielt herunterreguliert werden sollte, etablierten wir in unserer Forschungsgruppe in T24-Zellen ein induzierbares Expressionssystem. Vorteil dieser Methode ist nach einer Transfektion mit den entsprechenden Plasmiden für das induzierbare konditionale Expressionssystem TetON eine genaue Steuerung der EMMPRIN-Expression. Nur in T24-Zellen ließen sich Expressionsreduktionen der

EMMPRIN Protein-Level innerhalb unserer Versuchsanordnung reproduzieren. Es zeigte sich in T24-Zellen vor allem unter Verwendung der Expressionsplasmiden mit EMMPsh1 und EMMPsh2 die Inhibition der Gen-Expression um 90%. In den funktionellen Assays wurde dieses konditionale Expressionssystem nur im Bezug auf den Einfluss von EMMPRIN auf die Zellteilung (s. 3.5.1) berücksichtigt.

Damit steht für zukünftige Studien ein neues System zur Verfügung, mit dem die Biologie von EMMPRIN weiter bestimmt werden kann.

4.4 Funktionelle Untersuchungen an Harnblasenkarzinomzellen in-vitro in Abhängigkeit der EMMPRIN-Expression

Eine positive Korrelation zwischen verschiedenen Tumorstadien und entsprechend starker EMMPRIN-Expression wurde von uns in Bestätigung der Ergebnisse von Xue et al. in den histologischen Untersuchungen am Harnblasenkarzinom gezeigt (Xue, Lu et al. 2010). Hauptanliegen dieser Arbeit war, nach Etablierung entsprechender Methoden die möglichen Auswirkungen einer Genexpressionshemmung des EMMPRIN-Proteins auf Proliferation, Metabolismus, Apoptose und Migration von Zellen in funktionellen Assays in-vitro zu charakterisieren.

4.4.1 Korrelation zwischen EMMPRIN-Expression und Proliferation

Unsere Daten hinsichtlich des Einflusses von EMMPRIN auf die Zellproliferation im durchgeführten BrdU-Assay durch Messung der DNA-Synthese müssen kritisch betrachtet werden.

In RT112-Harnblasenkarzinomzellen wurde die EMMPRIN-Expression durch die siRNA-Oligonukleotide EMMPsi1 und EMMPsi2 inhibiert. Den tendenziell stärkeren Effekt bzgl. der verminderten EMMPRIN-Expression im Westernblot mit statistischer Signifikanz sieht man in allen Experimenten bei EMMPsi1 (s. Ergebnisse 3.4.1 und Abbildung 13). Hinsichtlich des Einflusses auf die Proliferation im BrdU-Assay war jedoch vor allem bei EMMPsi2 der signifikante Effekt nachweisbar (s. Ergebnisse 3.5.2.3 und Diagramm 7). Daher können wir siRNA-abhängige unspezifische Effekte nicht ausschließen.

Die Effekte des lentiviralen Expressionssystem (pLVTHEMMPsh2) auf die Proliferation wurden im BrdU-Assay mit RT112, T24, HT1376, 647V und 253J getestet: Hier zeigte sich vor allem bei den HT1376-Zellen in Korrelation zum verminderten Protein-Level im Westernblot (s. Abbildung 20) die deutlich verringerte Proliferationsrate im BrdU-Assay (s. Diagramm 8). Die anderen Zelllinien zeigten

ohne statistische Signifikanz Tendenzen einer Korrelation der verminderten EMMPRIN-Expression mit einer verminderte Proliferation im BrdU-Assay.

Auffällig war, dass die Effekte auf die Proliferations-Hemmung bei siRNA-Oligonukleotiden (Diagramm 7) wesentlich deutlicher waren als bei der reduzierten EMMPRIN-Expression mittels des lentiviralen Transduktionssystems (Diagramm 8). Ob dieser Effekt methodische Gründe hat, konnten wir in unseren Studien nicht belegen.

In einem weiteren Ansatz wurde von uns mit Hilfe des induzierbaren Expressionssystems durch Bestimmung der Zellzahl nachgewiesen, dass die Zahl lebender Zellen nach Induktion von siRNAs gegen EMMPRIN relativ zur Kontrolle deutlich nachlässt. Diese Daten unterstützen unsere Beobachtungen hinsichtlich eines Einflusses von EMMPRIN auf die Proliferation von Zellen.

Hinsichtlich der Untersuchung der EMMPRIN-abhängigen Proliferation im durchgeführten BrdU-Assay sind unsere Ergebnisse derzeit ohne Vergleich in publizierten Arbeiten, da andere Gruppen indirekte Messsysteme für die Detektion von Zellproliferation genutzt haben. Dazu gehört vor allem der MTT-Assay, der die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen misst. Xue et al. und auch die Forschungsgruppe um Han et al. zeigten in Harnblasenkarzinomzellen in einem MTT-Assay eine signifikant abgeschwächte Proliferation bei reduzierter EMMPRIN-Expression (Han, He et al. 2010; Xue, Lu et al. 2010). Konform zu unseren Ergebnissen der Expressionshemmung berichten Chen et al. nach durchgeführten MTT-Assays in Melanomzellen eine reduzierte Proliferation (Chen, Lin et al. 2006). Die Arbeitsgruppe um Zucker et al. hingegen konnte bei EMMPRIN-Überexpression in Brustkrebs-Zellen keinen Einfluss auf die Proliferation nachweisen (Zucker, Hymowitz et al. 2001). Zucker et al. verwendeten keinen Tetrazoliumsalz-Assay, sondern berechneten nach täglichem Abzählen der absoluten Zellzahlen über vier Tage die Verdoppelungszeiten der Zellen in Abhängigkeit der EMMPRIN-Expression und interpretierten dies im Sinne der Proliferation. Zwar wurde EMMPRIN hier in unterschiedlichen Tumorzell-Entitäten untersucht und das Proliferationsverhalten mittels unterschiedlicher Assays analysiert, aber man sollte aufgrund insgesamt widersprüchlicher Ergebnisse im Bereich des Einflusses von EMMPRIN auf die Zellproliferation diesen Aspekt in den verschiedenen Tumorentitäten sicherlich weiter diskutieren. Wir schlossen aus unseren Ergebnissen, dass die Inhibierung der EMMPRIN-Expression mittels siRNA-Silencing einen Einfluss auf die Zellproliferation hat.

Ein anderer Ansatz über eine forcierte Genüberexpression in anderen Tumorentitäten wurde in der Arbeit von Xue et al. verfolgt, indem man den Einfluss einer EMMPRIN-Überexpression auf die Proliferation analysierte (Xue, Lu et al. 2010). Welche Auswirkungen in unserem Fall eine Überexpression von EMMPRIN auf das progressive Verhalten der Harnblasenkarzinomzellen hat, könnte zur umfassenden Charakterisierung der EMMPRIN-Funktionen in weiteren Studien untersucht werden. Entscheidend bei der Beurteilung einer EMMPRIN-abhängigen Regulation proliferativer Vorgänge in Zellen ist jedoch die Aufklärung der zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen.

Reimers et al. stellten aufgrund ihrer ebenfalls widersprüchlichen Ergebnisse zum Einfluss von EMMPRIN auf die Proliferation zur Diskussion, ob unterschiedliche Glykosylierungsmuster an EMMPRIN unterschiedliche regulatorische Wirkung auf Signalübermittlung haben könnten (Reimers, Zafrakas et al. 2004). Hier bleibt die Frage offen, ob die Level von korrekt modifiziertem EMMPRIN die Signalübertragung in den Zellen direkt beeinflussen.

4.4.2 Metabolismus

In unserer Studie wurde über den XTT-Zellvitalitätstest die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen gemessen und wir wollten Informationen zum Metabolismus der Zellen gewinnen. Der Test kann bei entsprechender Standardisierung auch als indirekte Aussage für die Zellproliferation genutzt werden. Wie schon in 4.4.1 erwähnt, lassen sich in der aktuellen Literatur einige Daten zum als identisch zu wertenden MTT-Assay finden. Die Ergebnisse von Chen, Han und Xue et al. (vgl. Chen, Lin et al. 2006; Han, He et al. 2010; Xue, Lu et al. 2010) wurden von den Autoren jedoch im Sinne der Proliferation interpretiert.

In unserem Versuchsaufbau wurde die absolute Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen gemessen, was eine Aussage über die Vitalität der Zellen ermöglicht. Ein signifikanter Einfluss der verminderten EMMPRIN-Expression ließ sich nur Zelllinien-abhängig nachweisen. Vergleicht man die Auswirkungen der EMMPRIN-Expressionshemmung auf die Zellvitalität (s. Diagramm 4) mit der Proteinreduktion im Westernblot (s. Abbildung 20), fällt auf, dass in den T24- und den 253J-Harnblasenkarzinomzellen die deutliche EMMPRIN-Reduktion um 80% bzw. 50% eine signifikante Veränderung im Metabolismus der Zellen hervorrufen kann.

Warum sich andere Zelllinien, deren EMMPRIN-Expression durch pLVTHEMMPsh2 deutlich herunterreguliert ist (s. Abbildung 20), hinsichtlich der Metabolisierungsrate

im XTT-Zellvitalitäts-Assay nahezu unbeeinflusst zeigen, bleibt unklar. Hier könnten unterschiedlich genetische Defekte in den einzelnen Zelllinien mit unterschiedlich aktivierten Signaltransduktionswegen eine Erklärung darstellen.

4.4.3 EMMPRIN beeinflusst Caspasen-Aktivität und Apoptose

Im Apoptose-Test zeigte sich eine signifikant erhöhte Aktivität der untersuchten Caspasen 3 und 7 in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinien (Diagramm 5 und 6). Einige der hier verwendeten Zelllinien lassen sich nur mit geringer Effizienz transfizieren. Daher wurde für eine breit angelegte Untersuchung ein lentivirales System genutzt. Eine Erhöhung der Caspaseaktivität konnte in RT112 Zellen mit beiden Systemen belegt werden. Ebenfalls in HT1376 und 253J Zellen, nicht jedoch in T24 und 647V konnte eine signifikante Steuerung der Caspaseaktivität durch EMMPRIN Level beobachtet werden. Die Expression von EMMPRIN kann also die Kaskade der Caspasen innerhalb des programmierten Zelltodes unterbinden und somit zu einem Überleben der Tumorzelle beitragen. Es wäre also denkbar, dass EMMPRIN unterschiedlich starken Einfluss auf das Apoptoseverhalten der Zellen hat, je nach genetischem Hintergrund der Zelllinien. Die unterschiedlichen Harnblasenkarzinomzelllinien könnten exakt im Bereich der Steuerung der Signalkaskaden für die Apoptose einzelne Mutationen besitzen, welche die beobachteten Unterschiede in den Ergebnissen dieses Assays erklären.

Einen ebenfalls signifikanten Einfluss von EMMPRIN auf Apoptose und Zelltod publizierten 2010 Sidhu et al. nach Untersuchung von Lungenkarzinomzellen mit gentechnisch verändertem EMMPRIN-Level (Sidhu, Nawroth et al. 2010). Diese Tests wurden mittels eines AnnexinV-Stainings über eine FACS-Messung durchgeführt und zeigten eine Korrelation hinsichtlich EMMPRIN-Expression und Apoptose.

Unsere Daten zum Einfluss der EMMPRIN-Expression auf die Caspasen-Aktivität und damit das Apoptose-Verhalten der Harnblasenkarzinomzellen in-vitro sind derzeit in der aktuellen Literatur ohne Vergleich. Zwar wurde für EMMPRIN der Einfluss auf Signalkaskaden über diverse Kinasen und somit eine indirekte Steuerung von Zellüberleben bereits postuliert (Nawroth, Stohr et al. 2008), aber der direkte Nachweis in einem enzymatischen Test war bisher ausstehend.

4.4.4 Bedeutung von EMMPRIN für die Migration

Der durchgeführte Scratch-Assay sollte eine einfache Beobachtung der Migrationsvorgänge zum Schließen einer künstlich gesetzten Wunde im konfluenten

Zellrasen ermöglichen. Eine reduzierte EMMPRIN-Expression führte in unserem Versuchsaufbau zu einer verminderten Migrationsfähigkeit der Harnblasenkarzinomzellen. Die Migration einer Zelle aus einer Invasionsfront heraus ist als komplexer Vorgang unter Mitwirkung von vielen Faktoren an der Zelloberfläche zu sehen. Interaktionspartner wie Cyclophiline, Integrine, Caveolin-1 oder Monocarboxylattransporter, aber auch der Einfluss der Chemotaxis können hierbei eine Rolle spielen (Berditchevski, Chang et al. 1997; Sun and Hemler 2001; Tang, Chang et al. 2004; Tang and Hemler 2004; Deora, Philp et al. 2005; Yurchenko, Pushkarsky et al. 2005). Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Xue et al. aus dem Jahre 2010 ebenfalls an T-24 Harnblasenkarzinomzellen mit reduziertem EMMPRIN-Level (Xue, Lu et al. 2010) konnten wir durch unsere Daten aus dem Scratch-Assay für EMMPRIN eine zentrale Steuerfunktion innerhalb dieser Migrationsvorgänge zeigen. Wurde die EMMPRIN-Expression durch z.B. RNA-Interferenz inhibiert, dann zeigten die Harnblasenkarzinomzellen eine signifikant geringere Tendenz zu migrieren. Es muss jedoch im Hinblick auf unsere Ergebnisse angemerkt werden, dass der Prozess den Scratch zu schließen sowohl von Migration als auch von der Proliferation (s. 3.5.2.3) beeinflusst wird. Die von uns gezeigte Proliferationsinhibierung könnte daher für einen Teil dieses Effektes verantwortlich sein. Weiterer Regulator für diesen Prozess der Migration scheint die *Fokal Adhesion Kinase* (FAK) zu sein (Wozniak, Modzelewska et al. 2004; Mitra, Hanson et al. 2005). In einer Studie an Zellen des Leberzellkarzinoms wurde von Qiang et al. nachgewiesen, dass die für die Metastasierung essentielle Invasion und Adhäsion von Karzinomzellen u.a. über die aktive *Fokal Adhesion Kinase* FAK gesteuert wird, deren Expression direkt durch EMMPRIN beeinflusst wird (Qian, Zhang et al. 2008). EMMPRIN greift also auch über intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden in die Vorgänge der Migration und damit der Metastasierung von Karzinomzellen ein. Die Zusammenhänge zwischen einer erhöhten Expression der FAK und der dadurch gesteigerten Invasivität von Tumorzellen wurde in einigen Studien in verschiedenen Tumorentitäten mehrfach bestätigt (Owens, Xu et al. 1995; Golubovskaya, Finch et al. 2008). Unsere Daten zur EMMPRIN-abhängigen Migration liefern in Zusammenschau mit den Ergebnissen von Qian et al. (s.o.) Bausteine in der Erforschung des komplexen Prozesses der Tumorprogression. Somit erscheint EMMPRIN als potentieller Ansatzpunkt für gezielte Tumorthapien geeignet.

Hierzu im Widerspruch stehen die Ergebnisse von Reimers et al., die in einem 3-D-Modell keine Effekte von EMMPRIN auf die Migration oder die Auflösung von Zell-

Zell-Kontakten in Karzinomzellen feststellen konnten (Reimers, Zafrakas et al. 2004). In dieser Studie wurden die Zellen nicht als Einzelzellen, sondern in Form von Aggregaten (Sphäroiden) untersucht, um die Bedingungen in einem Tumor zu imitieren. Metastasierende Tumorzellen müssten durch eine kugelförmige Matrix aus Kollagen I, welches ein Hauptbestandteil des interstitiellen Bindegewebes ist, migrieren können. In diesem Modellsystem von Reimers et al. zeigte sich jedoch kein Einfluss von EMMPRIN auf die Migrationsfähigkeit der Zellen. Da die in-vitro Experimente in dieser Studie von Reimers et al. wie auch in unserer Forschungsarbeit ohne Einbeziehung tumor-assoziiertes Zellen wie immunologischer Zellen oder Fibroblasten durchgeführt wurden, spiegeln sie nicht die komplizierten Interaktionen innerhalb der Tumorprogression in-vivo wieder. Da bekannt ist, dass EMMPRIN mit umgebenden Tumorstroma interagiert, wären weiterführende in-vitro Studien, welche diese Gesamt-Biologie berücksichtigen notwendig. Anschließende Tierexperimente könnten die interessanten Aspekte dieser Studie unter Einbeziehung von mit EMMPRIN assoziierten Zellen näher beleuchten.

Trotz der diskussionswürdigen Ergebnisse weist der Großteil der Literaturdaten darauf hin, dass EMMPRIN eine Schlüsselrolle als Oberflächenprotein und auch als Adaptor zwischen unterschiedlichen Zelladhäsionsmolekülen in der Tumorprogression hat (Curtin, Meinertzhagen et al. 2005). Unsere Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass EMMPRIN im Harnblasenkarzinom an interzellulären Interaktionen und Vorgängen zwischen migrierenden Zellen und der extrazellulären Matrix maßgeblich beteiligt sein könnte.

4.5 EMMPRIN als mögliches Targetmolekül für zukünftige Therapie-Strategien beim Harnblasenkarzinom

Mit dem Ziel das Potential von EMMPRIN als Targetmolekül zukünftiger Therapie-Strategien im Harnblasenkarzinom zu definieren, stand in unserer Forschungsarbeit die gezielte Regulation der EMMPRIN-Expression durch RNA-Interferenz im Focus. Zusammenfassend kann für die von uns erhobenen Daten festgestellt werden, dass die Modulation der Expressionslevel von EMMPRIN sehr unterschiedliche Auswirkungen auf Proliferation, Apoptose und Vitalität der Zellen in Abhängigkeit des genetischen Hintergrundes der verwendeten Zelllinien hat. Eine genaue molekulare Charakterisierung von EMMPRIN ist daher notwendig, um Patienten identifizieren zu können, die von einer gegen EMMPRIN gerichteten Therapie profitieren können.

Die Arbeitsgruppe um Xu et al konnte unsere Befunde mit einer anderen Methode im Tiermodell und in einer klinischen Phase-1-Studie bestätigen: Mit einem zielgerichteten Antikörper gegen EMMPRIN in einem murinen Leberkarzinom-Xenograft-Tiermodell wurde das Tumorwachstum und die Neigung zur Metastasierung reduziert (Xu, Xu et al. 2007). In einem weiteren Schritt zeigte diese Forschungsgruppe in einer ersten Phase-II-Studie bei Patienten mit Leberzellkarzinom nach Behandlung mit dem EMMPRIN-Antikörper (Metuximab-LICARTIN) eine Größenabnahme des Tumors (Chen, Mi et al. 2006). Zu erwartende Nachteile eines zielgerichteten Antikörpers gegen EMMPRIN wären systemischen Nebenwirkungen, da EMMPRIN auch in gesunden Körperzellen physiologische Aufgaben hat, welche durch einen Antikörper empfindlich gestört werden könnten. Jedoch berichten Xu et al., dass die Patienten die Behandlung mit dem Antikörper gegen EMMPRIN insgesamt gut toleriert haben (Xu, Shen et al. 2007).

Ausgehend von unserer Forschungsarbeit würde in weiteren Studien der Einsatz eines anti-EMMPRIN Antikörpers oder siRNAs für das Urothelkarzinom sinnvoll sein. In Frage kämen dabei sowohl eine lokale Anwendung z.B. in Form einer Blasen-Instillation bei oberflächlichen Tumoren, als auch weitere Untersuchungen im Rahmen einer systemischen Anwendung. Für beide Strategien würden sich für eine weitere Charakterisierung murine orthotope Modelle anbieten, bei denen mit entsprechenden metastasierenden lokal wachsenden Zelllinien gearbeitet werden könnte.

Dass die Methode der siRNA grundsätzlich zielführend für die Entwicklung zukünftiger Tumorthérapie-Strategien wäre, zeigte sich auch in erfolgreichen Studien der klinischen Anwendung der jüngeren Vergangenheit (Keaney, Campbell et al. 2011; Liu, Wong-Staal et al. 2007). In kürzlich veröffentlichten klinischen Untersuchungen wurde teils mit Antikörpern, teils mit glykosylierten Nanopartikeln in lokaler oder systemischer Anwendung (Miele, Spinelli et al. 2012) erfolgreich mittels RNA-Interferenz in verschiedenen Tumorentitäten gearbeitet (Seth, Johns et al. 2012). Daher sollte aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit auch ein Einsatz der RNA-Interferenz gegen EMMPRIN mit siRNAs in einem orthotopen Mausmodell oder in der systemischen Anwendung im Harnblasenkarzinom getestet werden.

Würde der o.a. bereits im Leberzellkarzinom erfolgreich getestete Antikörper gegen EMMPRIN (Licartin-Metuximab) in einem orthotopen Tiermodell als Erweiterung unserer in vitro-Studien gute Ergebnisse liefern, könnte man auch das Potential von EMMPRIN für Kombinationstherapien mit bereits etablierten Zytostatika wie

Gemcitabin/Cisplatin oder Paclitaxel charakterisieren (Nawroth, Stohr et al. 2008). Dieser Ansatz wurde mit interessanten Ergebnissen im Ovarial- und Larynxkarzinom von den Forschungsgruppen um Zou et al. 2007 und Zhu et al. 2011 fortgeführt (Zou, Yang et al. 2007; Zhu, Pan et al. 2011).

Insgesamt konnten wir zeigen, dass EMMPRIN hoch-exprimiert im Harnblasenkarzinom vorliegt. Genetisches Silencing führt zu verminderter Proliferation und Migration und hat Einfluss auf Apoptoseverhalten und Metabolismus. Damit stellen wir zusammenfassend fest, dass EMMPRIN ein mögliches Targetmolekül in der Therapie des Urothelkarzinoms darstellen könnte.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Glykoprotein Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) ist ein multifunktionales Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie, welches viele Schritte der malignen Tumorprogression beeinflusst. Als Transmembranprotein induziert EMMPRIN in Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten, wie zum Beispiel dem Mamma- oder Lungenkarzinom, Zellprogression und aktiviert verschiedene Matrix-Metalloproteasen (MMP), die insbesondere eine Funktion bei der Metastasierung übernehmen. Ziele dieser Forschungsarbeit waren die Charakterisierung von EMMPRIN im humanen Harnblasenkarzinom und funktionelle Untersuchungen von EMMPRIN bei der Tumorprogression und Metastasierung des humanen Harnblasenkarzinoms *in vitro*. Unter anderem sollte das Potential von EMMPRIN als therapeutisches Zielmolekül näher beschrieben werden.

Durch Anwendung immunhistochemischer Methoden konnten wir das Expressionslevel von EMMPRIN auf histologischen Gewebsschnitten von Harnblasenkarzinom-Präparaten aus unterschiedlichen Patienten charakterisieren. Bei überwiegend membranständiger Lokalisation ist das EMMPRIN-Protein in Tumoren der Tumorstadien Ta, T1 und T2 und der Differenzierungsgrade G1 bis G3 nachweisbar. Die Analyse der EMMPRIN-Expression erfolgte in zehn Blasentumor-Zelllinien, welche sich in ihrer Tumorigenität und ihrem metastatischen Potential *in vivo* unterscheiden. *In vitro* konnte in der RT-PCR sowie in Zelllysaten und Zellüberständen mittels Western Blotting in allen Urothelkarzinom-Zelllinien eine deutliche EMMPRIN Gen- und Proteinexpression nachgewiesen werden.

Um die funktionelle Relevanz von EMMPRIN in Tumorzellen zu analysieren, wurde *in vitro* mittels siRNA-Technologie eine spezifische EMMPRIN-Inhibition in Tumorzellen induziert. Dabei wurde zum einen mit einer transienten Transfektion mit spezifischen siRNA-Oligonukleotiden gegen EMMPRIN gearbeitet, zum anderen wurde über eine Lentivirus-vermittelte Transduktion der Zellen die EMMPRIN Expression dauerhaft inhibiert. Wir etablierten zusätzlich ein konditionales siRNA-Expressionssystem, mit welchem die EMMPRIN-Expression inhibiert werden konnte. Mit allen genannten Methoden konnte eine Inhibierung der Expression von EMMPRIN auf Gen- und Proteinebene in den Harnblasenkarzinomzellen induziert werden.

Funktionell zeigten die EMMPRIN-inhibierten Blasentumorzellen in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund der verwendeten Zelllinie eine signifikante Reduktion der Proliferation. Hierfür wurde die Zell-Proliferation mittels der Inkorporation des

Thymidin-Analogons BrdU in FACS Analysen analysiert. Zusätzlich wurde das zelluläre Wachstum über 4 Tage verfolgt und eine Reduktion von über 50% nachgewiesen. Da EMMPRIN im Kontext von Metastasierung eine Funktion haben könnte, wurde von uns ein Migrationsassay durchgeführt, in welchem sich eine signifikante Reduktion der Migration für die Zellen mit niedrigem EMMPRIN-Level zeigte. Ein XTT-Zellvitalitätstest zur Untersuchung des Einflusses von EMMPRIN auf die Metabolisierungsrate von Karzinomzellen erbrachte keine signifikanten Ergebnisse. In einem Assay zum Nachweis aktivierter Caspasen konnten wir einen deutlichen Einfluss von EMMPRIN auf den programmierten Zelltod nachweisen: Harnblasenkarzinomzellen mit reduziertem EMMPRIN-Level haben eine statistisch signifikant erhöhte Aktivität der Caspasen. Diese funktionellen Ergebnisse müssen in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund der verwendeten Harnblasenkarzinomzelllinien interpretiert werden.

Damit konnte in der vorliegenden Arbeit mit verschiedenen Methoden gezeigt werden, dass EMMPRIN eine weitreichende Bedeutung für die Tumorprogression des humanen Harnblasenkarzinom hat.

Als erster weiterführender Schritt könnte die EMMPRIN-abhängige Tumorprogression des Harnblasenkarzinoms in-vitro in einem 3D-Modell z.B. an Sphäroiden einschließlich tumorassoziierter Zellen wie Fibroblasten und immunologischer Zellen untersucht werden. Komplizierte Interaktionen innerhalb der Tumorprogression könnten in Zellkulturmodellen und im Tiermodell näher charakterisiert werden.

Eine im Anschluss an diese Arbeit von uns initiierte in-vivo Studie im murinen Xenograft-Modell soll die grundlegenden Ergebnisse über die Funktion von EMMPRIN in der Tumorprogression des Harnblasenkarzinoms vervollständigen. In einem murinen Modell könnte die Injektion eines subkutanen Depots von Harnblasenkarzinomzellen mit reduziertem EMMPRIN-Level in immundefiziente Mäuse unter Beobachtung des veränderten Tumorwachstums zum besseren Verständnis der möglichen Funktionen von EMMPRIN beitragen (Nawroth, Hartmann et al. 2010). Auch könnte an so einem Modell die Funktion von EMMPRIN als Target-Molekül in einer Therapie an Zellen mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund weiter charakterisiert werden. Dabei könnten auch die von uns verwendeten Strategien der Applikation einer siRNA realisiert werden. In anderen Tumorentitäten ist dies teilweise bereits ein etablierter Therapieansatz (Miele, Spinelli et al. 2012;

Keaney, Campbell et al. 2011). Zusätzlich könnte ein spezifisch gegen EMMPRIN gerichteter monoklonaler Antikörper in einem weiteren Schritt im orthotopen Tiermodell Optionen für die gezielte Therapie des Harnblasenkarzinoms aufzeigen.

Hinsichtlich des gezielten Einsatzes von EMMPRIN als Parameter für die Prognose von Patienten mit Harnblasenkarzinom konnten wir Tendenzen durch unseren Tissue Micro Array aufzeigen, weisen jedoch auf eine weitere notwendige Evaluierung hin.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Afonso et al. thematisierte erneut das Potential von EMMPRIN bei nachgewiesener Überexpression als Entscheidungskriterium für ein personalisiertes Therapie-Regime bei aggressiven Harnblasenkarzinomen (Afonso, Longatto-Filho et al. 2011).

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit grundlegende Daten hinsichtlich einer möglichen Rolle von EMMPRIN als prognostischer Faktor und als Target-Molekül in einer Tumorthherapie gewonnen werden, die im Kontext bereits publizierter Studien eine weitere Charakterisierung dieses Moleküls unterstützen.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- Afonso J, Longatto-Filho A, Baltazar F, Sousa N, Costa FE, Morais A, Amaro T, Lopes C und Santos LL (2011). "CD147 overexpression allows an accurate discrimination of bladder cancer patients' prognosis." *Eur J Surg Oncol* 37(9): 811-817.
- Als AB, Dyrskjot L, von der Maase H, Koed K, Mansilla F, Toldbod HE, Jensen JL, Ulhoi BP, Sengelov L, Jensen KM und Orntoft TF (2007). "Emmprin and survivin predict response and survival following cisplatin-containing chemotherapy in patients with advanced bladder cancer." *Clin Cancer Res* 13(15 Pt 1): 4407-4414.
- Barrett T und Edgar R (2006). "Gene expression omnibus: microarray data storage, submission, retrieval, and analysis." *Methods Enzymol* 411: 352-369.
- Berditchevski F, Chang S, Bodorova J und Hemler ME (1997). "Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha3beta1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6." *J Biol Chem* 272(46): 29174-29180.
- Birnboim HC und Doly J (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523.
- Biswas C (1982). "Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts." *Biochem Biophys Res Commun* 109(3): 1026-1034.
- Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H und Nabeshima K (1995). "The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily." *Cancer Res* 55(2): 434-439.
- Burnette WN (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." *Anal Biochem* 112(2): 195-203.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW und Prasher DC (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." *Science* 263(5148): 802-805.
- Chen X, Lin J, Kanekura T, Su J, Lin W, Xie H, Wu Y, Li J, Chen M und Chang J (2006). "A small interfering CD147-targeting RNA inhibited the proliferation, invasiveness, and metastatic activity of malignant melanoma." *Cancer Res* 66(23): 11323-11330.
- Chen ZN, Mi L, Xu J, Song F, Zhang Q, Zhang Z, Xing JL, Bian HJ, Jiang JL, Wang XH, Shang P, Qian AR, Zhang SH, Li L, Li Y, Feng Q, Yu XL, Feng Y, Yang XM, Tian R, Wu ZB, Leng N, Mo TS, Kuang AR, Tan TZ, Li YC, Liang DR, Lu WS, Miao J, Xu GH, Zhang ZH, Nan KJ, Han J, Liu QG, Zhang HX und Zhu P

- (2006). "Targeting radioimmunotherapy of hepatocellular carcinoma with iodine (131I) metuximab injection: clinical phase I/II trials." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65(2): 435-444.
- Curtin KD, Meinertzhagen IA und Wyman RJ (2005). "Basigin (EMMPRIN/CD147) interacts with integrin to affect cellular architecture." *J Cell Sci* 118(Pt 12): 2649-2660.
- Dai JY, Dou KF, Wang CH, Zhao P, Lau WB, Tao L, Wu YM, Tang J, Jiang JL und Chen ZN (2009). "The interaction of HAb18G/CD147 with integrin alpha6beta1 and its implications for the invasion potential of human hepatoma cells." *BMC Cancer* 9: 337.
- Dean NR, Newman JR, Helman EE, Zhang W, Safavy S, Weeks DM, Cunningham M, Snyder LA, Tang Y, Yan L, McNally LR, Buchsbaum DJ und Rosenthal EL (2009). "Anti-EMMPRIN monoclonal antibody as a novel agent for therapy of head and neck cancer." *Clin Cancer Res* 15(12): 4058-4065.
- DeCastro R, Zhang Y, Guo H, Kataoka H, Gordon MK, Toole B und Biswas G (1996). "Human keratinocytes express EMMPRIN, an extracellular matrix metalloproteinase inducer." *J Invest Dermatol* 106(6): 1260-1265.
- Dennis JW, Granovsky M und Warren CE (1999). "Glycoprotein glycosylation and cancer progression." *Biochim Biophys Acta* 1473(1): 21-34.
- Deora AA, Philp N, Hu J, Bok D und Rodriguez-Boulan E (2005). "Mechanisms regulating tissue-specific polarity of monocarboxylate transporters and their chaperone CD147 in kidney and retinal epithelia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(45): 16245-16250.
- Dykxhoorn DM, Novina CD und Sharp PA (2003). "Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(6): 457-467.
- Egeblad M und Werb Z (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." *Nat Rev Cancer* 2(3): 161-174.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K und Tuschl T (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature* 411(6836): 494-498.
- Elbashir SM, Lendeckel W und Tuschl T (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." *Genes Dev* 15(2): 188-200.
- Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W und Tuschl T (2001). "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate." *EMBO J* 20(23): 6877-6888.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE und Mello CC (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 391(6669): 806-811.
- Fossum S, Mallett S und Barclay AN (1991). "The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence." *Eur J Immunol* 21(3): 671-679.

- Gabison EE, Hoang-Xuan T, Mauviel A und Menashi S (2005). "EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair." *Biochimie* 87(3-4): 361-368.
- Galat A (1993). "Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins." *Eur J Biochem* 216(3): 689-707.
- Golubovskaya VM, Finch R, Kweh F, Massoll NA, Campbell-Thompson M, Wallace, MR und Cance WG (2008). "p53 regulates FAK expression in human tumor cells." *Mol Carcinog* 47(5):373-82.
- Gossen M, Bonin AL und Bujard H (1993). "Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements." *Trends Biochem Sci* 18(12): 471-475.
- Gossen M und Bujard H (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(12): 5547-5551.
- Gossen M und Bujard H (1995). "Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type: commentary." *Biotechniques* 19(2): 213-216; discussion 216-217.
- Hamilton AJ und Baulcombe DC (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." *Science* 286(5441): 950-952.
- Han ZD, He HC, Bi XC, Qin WJ, Dai QS, Zou J, Ye YK, Liang YX, Zeng GH, Zhu G, Chen ZN und Zhong WD (2010). "Expression and clinical significance of CD147 in genitourinary carcinomas." *J Surg Res* 160(2): 260-267.
- Hillen W und Berens C (1994). "Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance." *Annu Rev Microbiol* 48: 345-369.
- Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E und Prydz H (2002). "Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor." *Nucleic Acids Res* 30(8): 1757-1766.
- Iacono KT, Brown AL, Greene MI und Saouaf SJ (2007). "CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology." *Exp Mol Pathol* 83(3): 283-295.
- Igakura T, Kadomatsu K, Kaname T, Muramatsu H, Fan QW, Miyauchi T, Toyama Y, Kuno N, Yuasa S, Takahashi M, Senda T, Taguchi O, Yamamura K, Arimura K und Muramatsu T (1998). "A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis." *Dev Biol* 194(2): 152-165.
- Jorgensen R (1990). "Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes." *Trends Biotechnol* 8(12): 340-344.
- Kanekura T und Chen X (2010). "CD147/basigin promotes progression of malignant melanoma and other cancers." *J Dermatol Sci* 57(3): 149-154.

- Keaney J, Campbell M und Humphries P (2011). "From RNA interference technology to effective therapy: how far have we come and how far to go?" *Ther Deliv* 2(11):1395-406.
- Kessenbrock K, Plaks V und Werb Z (2010). "Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment." *Cell* 141(1): 52-67.
- Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MH, Barclay AN und Halestrap AP (2000). "CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression." *EMBO J* 19(15): 3896-3904.
- Koch C, Staffler G, Huttinger R, Hilgert I, Prager E, Cerny J, Steinlein P, Majdic O, Horejsi V und Stockinger H (1999). "T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density." *Int Immunol* 11(5): 777-786.
- Laemmli UK (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lee JC, Chow NH, Wang ST und Huang SM (2000). "Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients." *Eur J Cancer* 36(6): 748-753.
- Li Y, Xu J, Chen L, Zhong WD, Zhang Z, Mi L, Zhang Y, Liao CG, Bian HJ, Jiang JL, Yang XM, Li XY, Fan CM, Zhu P, Fu L und Chen ZN (2009). "HAb18G (CD147), a cancer-associated biomarker and its role in cancer detection." *Histopathology* 54(6): 677-687.
- Liang CC, Park AY und Guan JL (2007). "In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro." *Nat Protoc* 2(2): 329-333.
- Liang L, Major T und Bocan T (2002). "Characterization of the promoter of human extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN)." *Gene* 282(1-2): 75-86.
- List AF (2001). "Vascular endothelial growth factor signaling pathway as an emerging target in hematologic malignancies." *Oncologist* 6 Suppl 5: 24-31.
- Liu G, Wong-Staal F und Li QX (2007). "Development of new RNAi therapeutics." *Histol Histopathol* 22(2):211-7.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL und Randall RJ (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* 193(1): 265-275.
- Masters JR, Hepburn PJ, Walker L, Highman WJ, Trejdosiewicz LK, Povey S, Parkar M, Hill BT, Riddle PR und Franks LM (1986). "Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines." *Cancer Res* 46(7): 3630-3636.
- Menashi S, Serova M, Ma L, Vignot S, Mourah S und Calvo F (2003). "Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase expression by amphiregulin in transformed human breast epithelial cells." *Cancer Res* 63(22): 7575-7580.

- Miele E, Spinelli GP, Miele E, Di Fabrizio E, Ferretti E, Tomao S und Gulino A. (2012/ Epub 2012 Jul 20). "Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy." *Int J Nanomedicine* 7: 3637-57.
- Millimaggi D, Mari M, D'Ascenzo S, Carosa E, Jannini EA, Zucker S, Carta G, Pavan A und Dolo V (2007). "Tumor vesicle-associated CD147 modulates the angiogenic capability of endothelial cells." *Neoplasia* 9(4): 349-357.
- Mitra SK, Hanson DA und Schlaepfer DD (2005). "Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(1):56-68.
- Miyauchi T, Kanekura T, Yamaoka A, Ozawa M, Miyazawa S und Muramatsu T (1990). "Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin V domain and the beta-chain of major histocompatibility complex class II antigen." *J Biochem* 107(2): 316-323.
- Miyauchi T, Masuzawa Y und Muramatsu T (1991). "The basigin group of the immunoglobulin superfamily: complete conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken HT7 antigen." *J Biochem* 110(5): 770-774.
- Muraoka K, Nabeshima K, Murayama T, Biswas C und Koono M (1993). "Enhanced expression of a tumor-cell-derived collagenase-stimulatory factor in urothelial carcinoma: its usefulness as a tumor marker for bladder cancers." *Int J Cancer* 55(1): 19-26.
- Nabeshima K, Iwasaki H, Koga K, Hojo H, Suzumiya J und Kikuchi M (2006). "Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression." *Pathol Int* 56(7): 359-367.
- Napoli C, Lemieux C und Jorgensen R (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans." *Plant Cell* 2(4): 279-289.
- Nawroth R, Hartmann A, Olbert PJ, Merseburger AS, Stohr R, Knuchel R, Retz M und Fussel S (2011). "[Bladder cancer update: what was new at the 2010 annual congress of the German Association of Urology in Dusseldorf?]." *Urologe A* 50(2): 221-226.
- Nawroth R, Hartmann A, Wild P, Lehmann J, Stohr R, Gschwend JE und Retz M (2010). "[EMMPRIN (CD147). A prognostic and potentially therapeutic marker in urothelial cancer]." *Pathologe* 31 Suppl 2: 251-254.
- Nawroth R, Stohr R, Hartmann A, Gschwend JE und Retz M (2008). "[EMMPRIN (CD147). A new key protein during tumor progression in bladder cancer]." *Urologe A* 47(9): 1152-1156.
- Owens LV, Xu L, Craven RJ, Dent GA, Weiner TM, Kornberg L, Liu ET und Cance WG (1995). "Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors." *Cancer Res* 55(13): 2752-5.

- Poon RT, Fan ST und Wong J (2001). "Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients." *J Clin Oncol* 19(4): 1207-1225.
- Qian AR, Zhang W, Cao JP, Yang PF, Gao X, Wang Z, Xu HY, Weng YY und Shang P. (2008). "Downregulation of CD147 expression alters cytoskeleton architecture and inhibits gelatinase production and SAPK pathway in human hepatocellular carcinoma cells." *J Exp Clin Cancer Res* 11: 27-50.
- Reimers N, Zafrakas K, Assmann V, Egen C, Riethdorf L, Riethdorf S, Berger J, Ebel S, Janicke F, Sauter G und Pantel K (2004). "Expression of extracellular matrix metalloproteases inducer on micrometastatic and primary mammary carcinoma cells." *Clin Cancer Res* 10(10): 3422-3428.
- Riethdorf S, Reimers N, Assmann V, Kornfeld JW, Terracciano L, Sauter G und Pantel K (2006). "High incidence of EMMPRIN expression in human tumors." *Int J Cancer* 119(8): 1800-1810.
- Rundhaug JE (2005). "Matrix metalloproteinases and angiogenesis." *J Cell Mol Med* 9(2): 267-285.
- Seth S, Johns R und Templin MV (2012). "Delivery and biodistribution of siRNA for cancer therapy: challenges and future prospects." *Ther Deliv* 3(2):245-61.
- Seulberger H, Lottspeich F und Risau W (1990). "The inducible blood--brain barrier specific molecule HT7 is a novel immunoglobulin-like cell surface glycoprotein." *EMBO J* 9(7): 2151-2158.
- Sidhu SS, Nawroth R, Retz M, Lemjabbar-Alaoui H, Dasari V und Basbaum C (2010). "EMMPRIN regulates the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway, a potential role in accelerating lung tumorigenesis." *Oncogene* 29(29): 4145-4156.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ und Klenk DC (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* 150(1): 76-85.
- Stoehr, R. und A. Hartmann. (2007). "Histopathologie und Molekulargenetik des Harnblasenkarzinoms." *Onkologie* 13: 1058-1066.
- Sun J und Hemler ME (2001). "Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions." *Cancer Res* 61(5): 2276-2281.
- Suzuki S, Sato M, Senoo H und Ishikawa K (2004). "Direct cell-cell interaction enhances pro-MMP-2 production and activation in co-culture of laryngeal cancer cells and fibroblasts: involvement of EMMPRIN and MT1-MMP." *Exp Cell Res* 293(2): 259-266.
- Tang W, Chang SB und Hemler ME (2004). "Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1." *Mol Biol Cell* 15(9): 4043-4050.

- Tang W und Hemler ME (2004). "Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering." *J Biol Chem* 279(12): 11112-11118.
- Tang Y, Nakada MT, Kesavan P, McCabe F, Millar H, Rafferty P, Bugelski P und Yan L (2005). "Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases." *Cancer Res* 65(8): 3193-3199.
- Tang Y, Nakada MT, Rafferty P, Laraio J, McCabe FL, Millar H, Cunningham M, Snyder LA, Bugelski P und Yan L (2006). "Regulation of vascular endothelial growth factor expression by EMMPRIN via the PI3K-Akt signaling pathway." *Mol Cancer Res* 4(6): 371-377.
- Towbin H, Staehelin T und Gordon J (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
- Voigt H, Vetter-Kauczok CS, Schrama D, Hofmann UB, Becker JC und Houben R (2009). "CD147 impacts angiogenesis and metastasis formation." *Cancer Invest* 27(3): 329-333.
- Wadkins RM und Jovin TM (1991). "Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA." *Biochemistry* 30(39): 9469-9478.
- Warburg O (1956). "On the origin of cancer cells." *Science* 123(3191): 309-314.
- Weidle UH, Scheuer W, Eggle D, Klostermann S und Stockinger H (2010). "Cancer-related issues of CD147." *Cancer Genomics Proteomics* 7(3): 157-169.
- Williams RD (1980). "Human urologic cancer cell lines." *Invest Urol* 17(5): 359-363.
- Wittschieber D, Stenzinger A, Klauschen F, Stephan C, Jung K, Erbersdobler A und Rabien A (2011). "Decreased RECK and Increased EMMPRIN expression in urothelial carcinoma of the bladder are associated with tumor aggressiveness." *Pathobiology* 78(3): 123-131.
- Wiznerowicz M und Trono D (2003). "Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference." *J Virol* 77(16): 8957-8961.
- Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L und Keely PJ (2004). "Focal adhesion regulation of cell behavior." *Biochim Biophys Acta* 1692(2-3):103-19.
- Xu J, Shen ZY, Chen XG, Zhang Q, Bian HJ, Zhu P, Xu HY, Song F, Yang XM, Mi L, Zhao QC, Tian R, Feng Q, Zhang SH, Li Y, Jiang JL, Li L, Yu XL, Zhang Z und Chen ZN (2007). "A randomized controlled trial of Licartin for preventing hepatoma recurrence after liver transplantation." *Hepatology* 45(2): 269-276.
- Xu J, Xu HY, Zhang Q, Song F, Jiang JL, Yang XM, Mi L, Wen N, Tian R, Wang L, Yao H, Feng Q, Zhang Y, Xing JL, Zhu P und Chen ZN (2007). "HAb18G/CD147 functions in invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma." *Mol Cancer Res* 5(6): 605-614.

- Xue YJ, Lu Q und Sun ZX (2010). "CD147 overexpression is a prognostic factor and a potential therapeutic target in bladder cancer." *Med Oncol*.
- Yan L, Zucker S und Toole BP (2005). "Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression." *Thromb Haemost* 93(2): 199-204.
- Yoshida S, Shibata M, Yamamoto S, Hagihara M, Asai N, Takahashi M, Mizutani S, Muramatsu T und Kadomatsu K (2000). "Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamily member, via its N-terminal immunoglobulin domain." *Eur J Biochem* 267(14): 4372-4380.
- Yu XL, Jiang JL, Li L, Feng Q, Xu J und Chen ZN (2006). "The glycosylation characteristic of hepatoma-associated antigen HAb18G/CD147 in human hepatoma cells." *Int J Biochem Cell Biol* 38(11): 1939-1945.
- Yurchenko V, O'Connor M, Dai WW, Guo H, Toole B, Sherry B und Bukrinsky M (2001). "CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B." *Biochem Biophys Res Commun* 288(4): 786-788.
- Yurchenko V, Pushkarsky T, Li JH, Dai WW, Sherry B und Bukrinsky M (2005). "Regulation of CD147 cell surface expression: involvement of the proline residue in the CD147 transmembrane domain." *J Biol Chem* 280(17): 17013-17019.
- Yurchenko V, Zybarth G, O'Connor M, Dai WW, Franchin G, Hao T, Guo H, Hung HC, Toole B, Gallay P, Sherry B und Bukrinsky M (2002). "Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147." *J Biol Chem* 277(25): 22959-22965.
- Zheng HC, Takahashi H, Murai Y, Cui ZG, Nomoto K, Miwa S, Tsuneyama K und Takano Y (2006). "Upregulated EMMPRIN/CD147 might contribute to growth and angiogenesis of gastric carcinoma: a good marker for local invasion and prognosis." *Br J Cancer* 95(10): 1371-1378.
- Zhong WD, Chen QB, Ye YK, Han ZD, Bi XC, Dai QS, Liang YX, Zeng GH, Wang YS, Zhu G, Chen ZN und He HC (2010). "Extracellular matrix metalloproteinase inducer expression has an impact on survival in human bladder cancer." *Cancer Epidemiol* 34(4): 478-482.
- Zhou J, Zhu P, Jiang JL, Zhang Q, Wu ZB, Yao XY, Tang H, Lu N, Yang Y und Chen ZN (2005). "Involvement of CD147 in overexpression of MMP-2 and MMP-9 and enhancement of invasive potential of PMA-differentiated THP-1." *BMC Cell Biol* 6(1): 25.
- Zhu C, Pan Y, He B, Wang B, Xu Y, Qu L, Bao Q, Tian F und Wang S (2011). "Inhibition of CD147 gene expression via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumorigenicity and increases chemosensitivity to cisplatin in laryngeal carcinoma Hep2 cells." *Oncol Rep* 25(2): 425-432.
- Zou W, Yang H, Hou X, Zhang W, Chen B und Xin X (2007). "Inhibition of CD147 gene expression via RNA interference reduces tumor cell invasion,

tumorigenicity and increases chemosensitivity to paclitaxel in HO-8910pm cells." *Cancer Lett* 248(2): 211-218.

Zucker S, Hymowitz M, Rollo EE, Mann R, Conner CE, Cao J, Foda HD, Tompkins DC und Toole BP (2001). "Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer." *Am J Pathol* 158(6): 1921-1928.

6.2 Buchbeiträge und Monographien

- Eble J.E., Sauter G., Epstein J.I. und Sesterhenn I.A.: Tumors of the urinary system and male genital organs. WHO classification of tumors; IA-RC Press, Lyon 2004.
- Reimers N.: Untersuchungen zur Rolle von EMMPRIN bei der Progression des humanen Mammakarzinoms; als Dissertation vorgelegt, Hamburg 2006.
- Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg): Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends; 6. überarbeitete Auflage, Berlin 2008.
- Rübber H. und Otto T.: Harnblasenkarzinom; 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, 2001.
- Albrecht S., Brandl H. und Zimmermann Th.: Chemolumineszenz; Hüthig Verlag, Heidelberg 1996.
- Treiber U., Zaak D., Tumorzentrum München (Hrsg): Manual Urogenitale Tumoren, 4. Auflage, W. Zuckerschwerdt Verlag, München 2008.

6.3 Internetquellen

- CLONTECH Product Catalog – Tet-Off® and Tet-On® Gene Expression System; User Manual, S.43 unter:
http://www.clontech.com/DE/Products/Inducible_Systems/Tetracycline-Inducible_Expression/Systems_1_and_2?sitex=10024:22372:US vom 12.12.2011.
- Dissertationsschrift Reimers N.: Untersuchungen zur Rolle von EMMPRIN bei der Progression des humanen Mammakarzinoms, Hamburg 2006, unter:
http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2006/2961/pdf/Natalie_Reimers_-_Dissertation-klein.pdf vom 01.11.2012.
- Design der Lentiviren/Protokolle und Anleitung unter: <http://lentiweb.com/> vom 13.11.2008 bzw. <http://tronolab.epfl.ch/page58115.html> vom 03.12.2009.
- Invitrogen, RNAi - Epigenetik und Genregulation unter:
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/RNAi-Epigenetics-and-Gene-Regulation/RNAi/Vector-based-RNAi/shRNA-Vectors.html> vom 31.08.2010.
- Produktinformationen zu Renilla-Luciferase und GFP unter: <http://www.patent-de.com/20041014/DE69726306T2.html> vom 09.08.2010.
- Technik der RNA-Interferenz unter:
http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html vom 03.12.2009.
- Übersicht und Herkunft verwendeter Plasmide unter:
http://www.addgene.org/Didier_Trono vom 12.12.2011.

6.4 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Tumoreindringtiefe des Harnblasenkarzinoms. | 11 |
| Abbildung 2: Schema der molekularen EMMPRIN-Struktur | 15 |
| Abbildung 3: Glykosylierung von EMMPRIN und MMP-Induktion | 18 |
| Abbildung 4: Herstellung doppelsträngiger shRNA (Invitrogen) | 34 |
| Abbildung 5: Block-iT™ shRNA Entry Vector pENTR™/H1/TO..... | 35 |
| Abbildung 6: Vektorkarte und MCS von pTRE2hyg..... | 36 |
| Abbildungen 7 a) und b): Das Tet-System: Tet-On/Off-Einheit und Tet-responsives Element | 47 |
| Abbildung 8: FACS-Messung von RT112..... | 55 |
| Abbildung 9: schematischer Aufbau des Westernblot | 60 |
| Abbildung 10: Analyse der EMMPRIN-Expression in der RT-PCR in humanen Harnblasenkarzinomzelllinien..... | 63 |
| Abbildung 11: Analyse der EMMPRIN-Expression im anti-EMMPRIN Immunoblot in humanen Harnblasenkarzinomzelllinien | 64 |
| Abbildung 12: Immunhistologische Färbung von EMMPRIN | 65 |
| Abbildung 13: EMMPRIN-Silencing durch siRNA-Oligonukleotiden in RT112 an drei aufeinanderfolgenden Tagen nach Transfektion | 67 |
| Abbildung 14: EMMPRIN-Silencing durch siRNA-Oligonukleotiden in T24 an drei aufeinanderfolgenden Tagen nach Transfektion | 67 |
| Abbildung 15: EMMPRIN-Silencing durch siRNA-Oligonukleotiden in RT112 an den Tagen d2-5 nach Transfektion | 68 |
| Abbildung 16: siRNA-Oligonukleotid vermittelte transiente Inhibition der EMMPRIN-Expression | 69 |
| Abbildungen 17 a) und b): RT112 bzw. T24 transduziert mit GFP und shRNA gegen die EMMPRIN-Sequenz mittels Lentivirus..... | 71 |
| Abbildung 18: Lentivirus-vermittelte Transduktion von RT112-Zellen mit EMMPRIN-shRNA bzw. ctrl.-shRNA | 72 |
| Abbildung 19: Lentivirus-vermittelte Transduktion von T24-Zellen mit EMMPRIN-shRNA bzw. ctrl.-shRNA | 72 |
| Abbildung 20: Herunterregulierung der EMMPRIN-Expression mittels Lentivirus-induzierten shRNA-Silencings in RT112, T24, HT1376, 647V und 253J | 73 |
| Abbildung 21: Konstitutive Inhibition der EMMPRIN-Expression in T24-Zellen mittels des Doxyzyklin-induzierbaren pTETON-Systems | 76 |
| Abbildung 22: FACS-Messung von RT112+pLVTHM hinsichtlich GFP-Fluoreszenz und Analyse von APC-konjugiertem Antikörper gegen BrdU..... | 84 |
| Abbildung 23: Migrationsverhalten von RT112 mit siRNA-Oligonukleotid-vermitteltem EMMPRIN-Silencing im Scratch-Assay | 87 |
| Abbildung 24: Migrationsverhalten von RT112 mit Lentivirus-vermitteltem EMMPRIN-Silencing im Scratch-Assay..... | 90 |
| Abbildung 25: Migrationsverhalten von T24 mit Lentivirus-vermitteltem EMMPRIN-Silencing im Scratch-Assay..... | 90 |

6.5 Diagrammverzeichnis

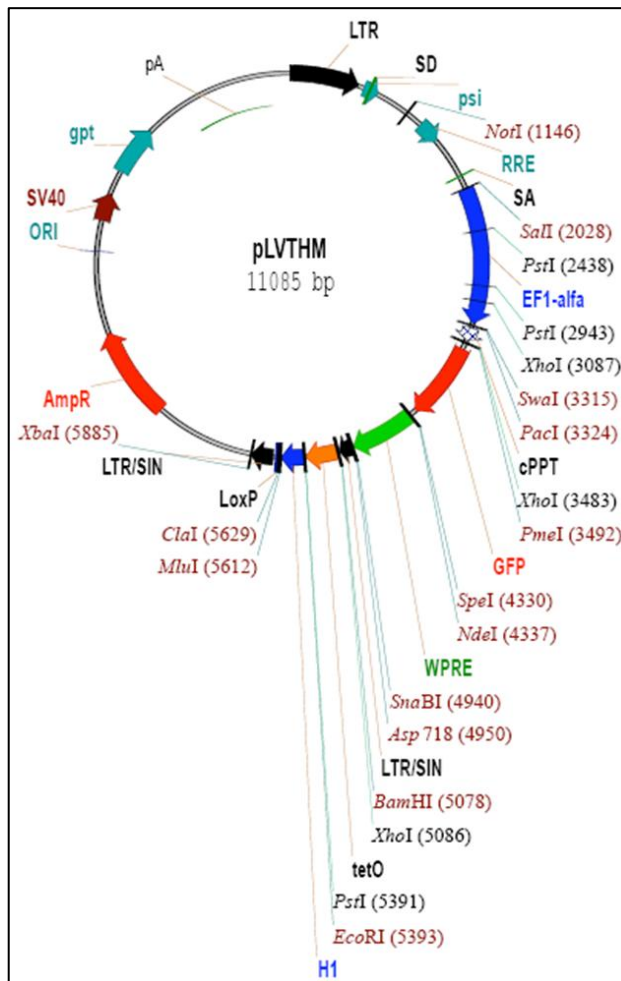
| | |
|--|----|
| Diagramm 1: EMMPRIN-Expression auf RNA-Ebene im Urothelkarzinom im Vergleich zu gesundem Harnblasengewebe..... | 21 |
| Diagramm 2: Luciferase-Aktivität in T 24..... | 75 |
| Diagramme 3 a) – d): EMMPRIN-Silencing hat Einfluss auf die Zellteilung. | 78 |
| Diagramm 4: Mittels Lentivirus mit shRNA gegen EMMPRIN transduzierte RT112, T24, HT1376, 647V und 253J im XTT-Zellvitalitäts-Assay | 80 |
| Diagramm 5: Erhöhte Caspase-Aktivität in RT112, deren EMMPRIN-Expression durch si-Oligonukleotide inhibiert wird..... | 81 |
| Diagramm 6: Caspase-Aktivität in Abhängigkeit von der EMMPRIN-Expression..... | 82 |
| Diagramm 7: BrdU-Inkorporation bzw. Proliferationsraten in % von RT112..... | 83 |
| Diagramm 8: BrdU-Inkorporation bzw. Proliferationsraten in % von RT112, T24, HT1376, 647V und 253J | 85 |
| Diagramm 9: BrdU-Inkorporation bzw. Proliferationsraten in Abhängigkeit von der EMMPRIN-Expression | 86 |
| Diagramme 10 a) - c): Migrationsverhalten von RT112 mit siRNA-Oligonukleotid vermitteltem EMMPRIN-Silencing im Scratch-Assay..... | 89 |
| Diagramm 11: Migrationsverhalten von RT112 mit Lentivirus-vermitteltem EMMPRIN-Silencing im Scratch-Assay..... | 90 |
| Diagramm 12: Migrationsverhalten von T24 mit Lentivirus-vermitteltem EMMPRIN-Silencing im Scratch-Assay..... | 90 |

6.6 Tabellenverzeichnis

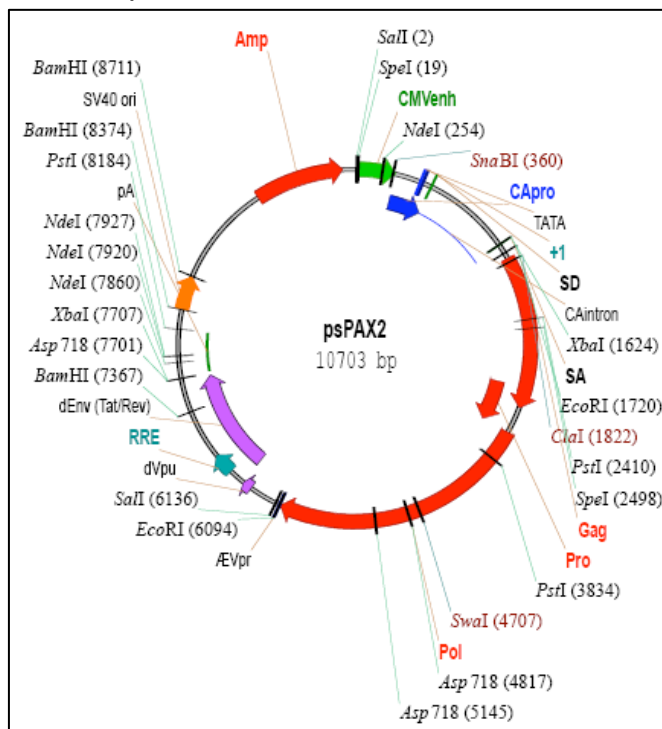
| | |
|--|----|
| Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms nach UICC 2002 | 10 |
| Tabelle 2: WHO-Klassifikation von Tumoren 2004..... | 12 |
| Tabelle 3: Puffer, Lösungen, Medien..... | 23 |
| Tabelle 4: Monoklonale Primärantikörper | 23 |
| Tabelle 5: Sekundärantikörper | 23 |
| Tabelle 6: Plasmide und Vektoren..... | 24 |
| Tabelle 7: Oligonukleotide | 25 |
| Tabelle 8: Geräte..... | 26 |
| Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien | 27 |
| Tabelle 10: verwendete Harnblasenkarzinomzelllinien..... | 29 |
| Tabelle 11: verwendete Kulturschalen | 31 |
| Tabelle 12: Sequenzen der verwendeten shRNA-Einzelstränge..... | 34 |
| Tabelle 13: Zeit-Temperatur-Schema Multicycler..... | 41 |
| Tabelle 14: In der PCR verwendete Primer | 41 |
| Tabelle 15: Schema zur PCR | 41 |
| Tabelle 16: Amplifikationsprogramm PCR..... | 42 |

6.7 Plasmidkarten

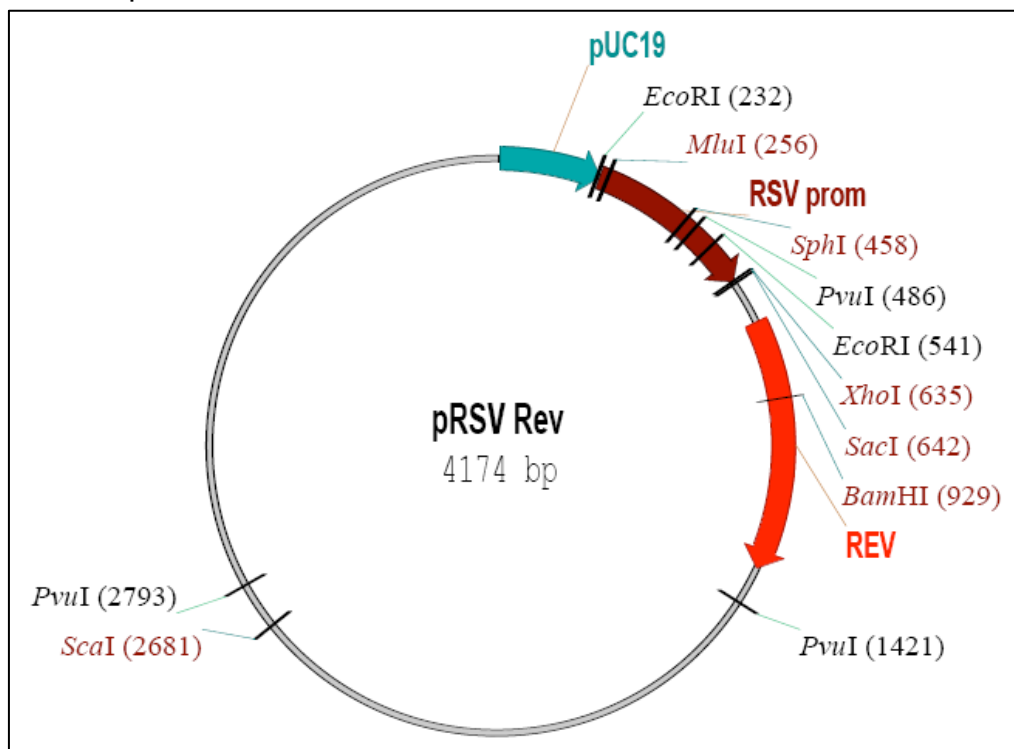
- Plasmid pLVTHM



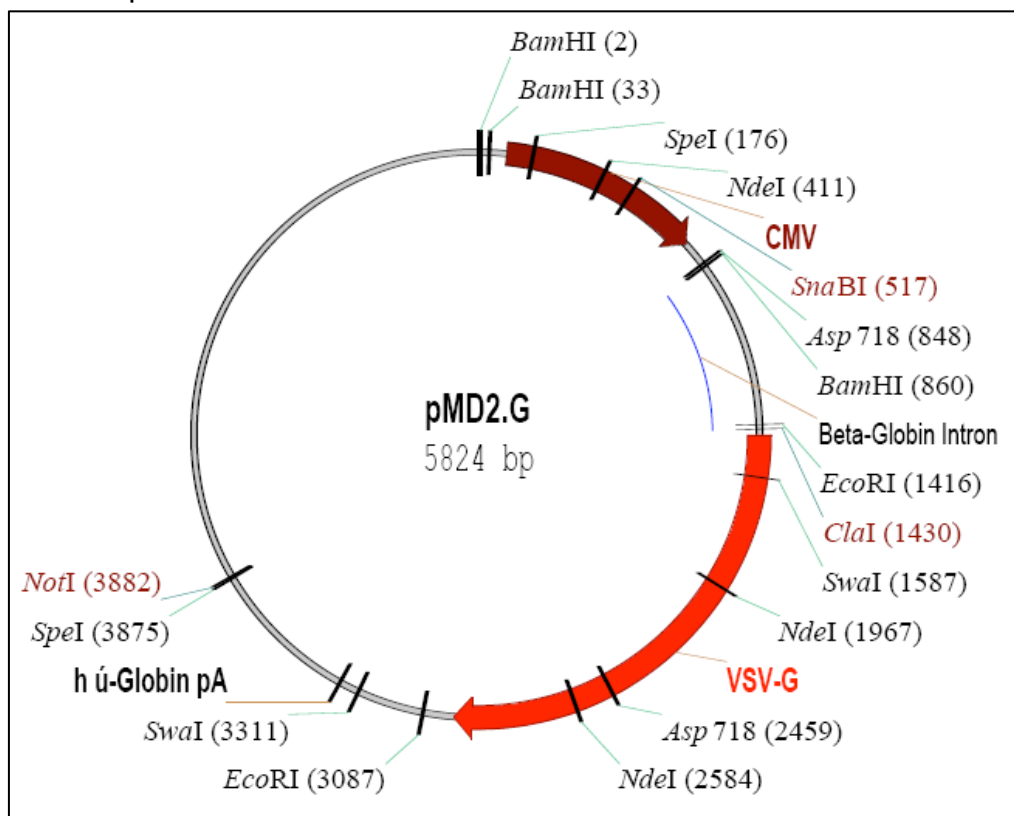
- Plasmid psPAX2



- Plasmid pRSV Rev



- Plasmid pMD2.G



Danksagung

Meinem Doktor-Vater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen E. Gschwend möchte ich danken für die Möglichkeit im Forschungslabor seiner Urologischen Klinik und Poliklinik am Klinikum Rechts der Isar der TU München diese Arbeit durchzuführen. Außerdem sei für seine großzügige Unterstützung bei meiner Teilnahme am *Annual Meeting* der *American Urological Association AUA* vom 25.-30. April 2009 in Chicago, Illinois gedankt.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Roman Nawroth für die Überlassung dieses spannenden Promotionsthemas. Ein herzlicher Dank für seine intensive und konstruktive Betreuung der Arbeit in Theorie und Praxis, die mit unerschöpflicher Fachkenntnis und Ideenreichtum erfolgte. Als Laborleiter der Experimentellen Urologie am Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München stand er mir jederzeit bei Fragen mit Rat und Tat zur Seite.

Dem Team des urologischen Forschungslabors des Klinikums Rechts der Isar der TU München statue ich Dank ab für die zuverlässige Hilfe bei Problemen aller Art und der geduldigen Beantwortung all meiner Fragen. Namentlich seien hier Frau Doris Langer, Frau Stefanie Rämisch, Frau Monika Moissl und Frau Claude Krämer erwähnt. Ich danke herzlich Frau Melanie Niedermeier für die tatkräftige Unterstützung beim Layout und der Drucklegung dieser Arbeit.

Für das Korrigieren des Manuskriptes danke ich ganz herzlich meinem Kommilitonen Dr.med. Johannes Gärtner.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern danke ich für ihre Geduld, Toleranz und Unterstützung jeglicher Art während meines gesamten Medizinstudiums und meiner Promotion.

Und nicht zuletzt danke ich Gott, dass er mich durch alle Höhen und Tiefen des Studiums und der Promotion sicher geführt hat.

Lebenslauf

Angaben zur Person: **Andreas** Robert Kurzrock
geb. 09. Februar 1983 in Starnberg

Sprachkenntnisse: Deutsch, Englisch, Spanisch

Schulbildung:
1989 - 1993 Grundschole Pfronten bzw. Eberfing
1993 - 2002 Gymnasium Weilheim i.OB
06/2002 **Allgemeine Hochschulreife**

Bundeswehr - Grundwehrdienst:
01 - 09/2003 Grundwehrdienst im Sanitätsdienst
03 - 06/2003 **Offizierlehrgang** für Sanitätsoffizieranwärter (SanOA) in der Sanitäts-akademie der Bundeswehr München mit „Befähigung zum Offizier“ erfolgreich absolviert

Universitärer Werdegang:
2003 - 2005 Vorklinischer Studienabschnitt Humanmedizin LMU/TU München
08/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005 - 2010 Klinischer Studienabschnitt am Klinikum Rechts der Isar der TUM
07/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung / **Approbation** als Arzt
2007 - 2012 **Promotion** Experimentelle Urologie Klinikum rechts der Isar TUM bei Univ.-Prof. Dr. med. J.E. Gschwend; Thema der experimentellen Arbeit: „**EMMPRIN (CD147) – Ein Schlüsselprotein in der Tumprogression des Harnblasenkarzinoms**“

Famulaturen (Auswahl):
09/2005 Famulatur **Chirurgie/Orthopädie** Krankenhaus Tutzing
03/2006 Famulatur **Innere Medizin** Krankenhaus Weilheim
08/2006 Famulatur **Urologie** Krankenhaus der Barmherzigen Brüder München
09/2007 Famulatur **Hausärztliche Allgemeinmedizin** Seeshaupt

Praktische Jahr PJ 2009/2010:
1. Tertial: **Urologie** (Klinikum Rechts der Isar München, Prof. Gschwend)
2. Tertial: **Kardiologie** (Dt. Herzzentrum München, Prof. Schömig)
Gastro-Enterologie (Klinikum Rechts der Isar München, Prof. Schmid)
3. Tertial: **Unfallchirurgie** (Klinikum St. Elisabeth Straubing, Prof. Oedekoven)
Viszeral-/Gefäßchirurgie (Klinikum St. Elisabeth Straubing, Dr. Krenz)

Auslandsaufenthalte/Praktische Tätigkeiten:
02 - 04/2007 Sprachkurs, Labor-Praktikum und medizinisch-klinische Ausbildung im Fachbereich Urologie in Guadalajara / Mexiko
06 – 12/2008 OP-Assistent orthopädische Privatklinik in München (Schwerpunkt: Wirbelsäulen-Chirurgie)
seit 09/2010 **Assistenzarzt Unfallchirurgie / Sportorthopädie** im Kreisklinikum Bad Reichenhall
Chefarzt PD Dr. Hente

Preise/Poster:
09/2008 **Preisträger** des Nachwuchs-Förderprogramms der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V. 2008 „*Die Besten für die Urologie*“
09/2008 **1. Posterpreis**: verliehen von der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V. anlässlich des 60. Kongresses in Stuttgart 2008; Titel: „*EMMPRIN (CD147): Ein Schlüsselprotein in der Tumprogression des Harnblasenkarzinoms*“
03/2009 **Best of Posters 2009**: Annual Meeting of the European Association of Urology, Stockholm, Sweden; Titel: „*EMMPRIN (CD147): A potential new target in the tumor progression of bladder cancer*“
04/2009 **Best of Posters 2009**: Annual Meeting of the American Urological Association, Chicago, IL; Titel: „*EMMPRIN (CD147): A potential new target in the tumor progression of bladder cancer*“
06/2009 **Poster-Präsentation** auf dem Bayerisch-Österreichischen Urologenkongress in Salzburg 18.-20. Juni 2009; Titel: „*EMMPRIN (CD147): Ein Schlüsselprotein in der Tumprogression des Harnblasenkarzinoms*“

Bischofswiesen, September 2013

