

Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Klinik für Innere Medizin III,
Hämatologie/Onkologie/Palliativmedizin

Direktor (komm.): Prof. Dr. med. Christian Junghanß

**Expression und Einfluss des Multi-KH-Domänenproteins Vigilin auf
Proliferation und Apoptose in Zellen der Akuten Myeloischen Leukämie**

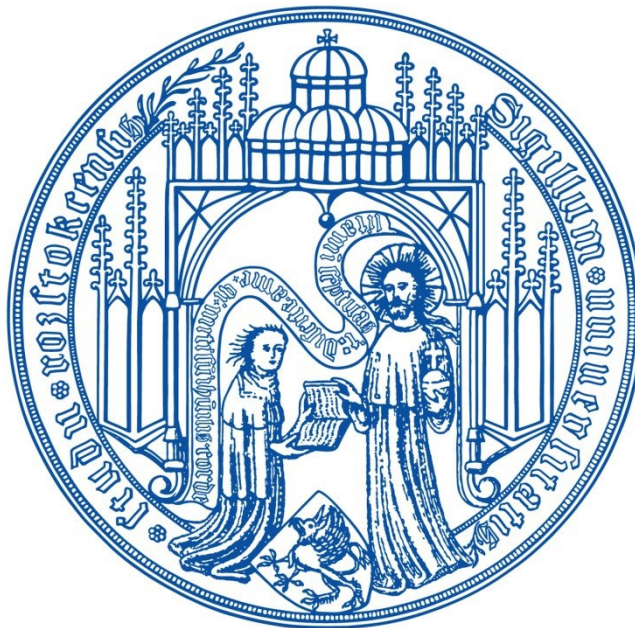
Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock



vorgelegt von

Christoph Wittke, geb. am 10.09.1981 in Vielist
aus Rostock

Rostock, 20.03.2014

1. Gutachter: Prof Dr. med. Ch. Junghanß, Universitätsmedizin Rostock, Zentrum für Innere Medizin, Klinik für Innere Medizin III, Hämatologie/Onkologie/Palliativmedizin

2. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Erbersdobler, Universität Rostock, Medizinische Fakultät, Institut für Pathologie

3. Gutachter: Prof. Dr. med. vet. I. Nolte, Tierärztliche Hochschule Hannover, Kleintierklinik

Öffentliche Verteidigung am 20.05.2014

» Alles nimmt ein gutes Ende für den,
der warten kann. «

- Lew Nikolajewitsch Graf Tolstoi -

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Akute myeloische Leukämien	1
1.2 Das Multi-KH-Domänenprotein Vigilin	5
1.3 RNA-Interferenz.....	10
1.4 Zielstellung	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Zellbiologische Methoden	13
2.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien	13
2.1.2 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC)	14
2.1.3 Einstellung der Zellzahl und Bestimmung der Vitalität	16
2.1.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	16
2.2 Transfektion von AML-Zelllinien mit small interfering RNA (siRNA)	16
2.3 Transfektion mittels Elektroporation	17
2.4 Durchflusszytometrie	18
2.4.1 Bestimmung der siRNA Transfektionseffizienz	19
2.4.2 Apoptosenachweis	19
2.5 Konfokale Laser-Rastermikroskopie	21
2.5.1 Färbung mit PKH26GL	22
2.6 Molekularbiologische Methoden	22
2.6.1 RNA-Isolierung	22
2.6.2 Bestimmung der RNA-Konzentration	22
2.6.3 Reverse Transkription	23
2.6.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	23

2.6.5	Agarosegelelektrophorese	25
2.6.6	Herstellung von Proteinextrakten	26
2.6.7	Proteinbestimmung nach Bradford	26
2.6.8	Western Blot	28
2.6.8.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
2.6.8.2	Semi-Dry-Western-Blot	28
2.6.8.3	Proteinfärbung über Ponceau S	29
2.6.8.4	Blockierung und Immunreaktion	29
2.6.9	Nachweis des Primär-Antikörpers mittels alkalischer Phosphatase	30
2.6.10	Nachweis des Primär-Antikörpers mittels Chemielumineszenz	30
2.7	WST1- Zellproliferationstest	31
2.8	Statistik	31
2.9	Materialien	32
2.9.1	Geräte und Materialien	32
2.9.2	Kits und Fertiglösungen	33
2.9.3	Nährmedien und Antibiotika	34
2.9.4	Enzyme	34
2.9.5	Chemikalien	34
2.9.6	Puffer und Lösungen	35
3	Ergebnisse	38
3.1	Vigilin-Expression in Zellen der AML	38
3.2	Transfektionsergebnisse	40
3.2.1	Ergebnisse der Transfektionseffizienz	40
3.2.1.1	Konfokale Laserrastermikroskopie	41
3.2.1.2	Durchflusszytometrie	42
3.2.2	Ergebnisse des Western Blot	42
3.2.3	Ergebnisse der Zellzählung.....	44
3.2.4	Ergebnisse des WST1-Test	44

3.2.5	Ergebnisse der Durchflusszytometrie	45
4	Diskussion	48
5	Zusammenfassung	53
6	Thesen	55
7	Literaturverzeichnis	57
	Danksagung	64
	Selbstständigkeitserklärung	65
	Tabellarischer Lebenslauf	66

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Vigilin in verschiedenen Spezies	7
Abbildung 2	Vigilin im RNA-Transportzyklus	8
Abbildung 3	Exonstruktur des humanen Vigilingens	9
Abbildung 4	Genregulation durch RNA-Interferenz	10
Abbildung 5	Bestimmung der Transfektionseffizienz	19
Abbildung 6	Detektion früh- und spätapoptotischer Zellen	20
Abbildung 7	Schematischer Aufbau eines semi dry Western Blot	29
Abbildung 8	Vigilin mRNA-Expression	39
Abbildung 9	Vigilin Protein-Expression	40
Abbildung 10	Ermittlung der Transfektionseffizienz mittels LSM	41
Abbildung 11	Bestimmung der Transfektionseffizienz bei HL60 und NB4	42
Abbildung 12	Vigilin-Protein-Expression nach Transfektion der Zelllinie HL60	43
Abbildung 13	Vigilin-Protein-Expression nach Transfektion der Zelllinie NB4	43
Abbildung 14	Bestimmung der Zellzahl nach Transfektion bei HL60 und NB4	44
Abbildung 15	Metabolische Aktivität nach Transfektion bei HL60 und NB4	45
Abbildung 16	Früh- und spätapoptotische Zellen nach Transfektion von HL60	46
Abbildung 17	Früh- und spätapoptotische Zellen nach Transfektion von NB4	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	FAB Klassifikation der AML	2
Tabelle 2	WHO-Klassifikation der AML	3
Tabelle 3	<i>de novo</i> -AML und deren Charakteristika	15
Tabelle 4	Fluoreszenzfarbstoffe der Durchflusszytometrie	18
Tabelle 5	Fluoreszenzfarbstoffe der LSM	21
Tabelle 6	Primer und Sequenzen der PCR	24
Tabelle 7	PCR-Bedingungen des Vigilins und β 2-Mikroglobulins	25
Tabelle 8	Herstellung der Standardreihe für den Bradford-Test	27
Tabelle 9	Primär-Antikörper	29
Tabelle 10	Sekundär-Antikörper	30
Tabelle 11	mRNA und Protein-Nachweis in <i>de novo</i> -AML Blasten	38

Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloische Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	all trans retinoic acid (All-trans-Retinolsäure)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	base pairs (Basenpaare)
BSA	bovines Serumalbumin
CBF β /MYH11	Core-binding factor subunit beta/myosin heavy chain 11
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DDP1	Drosophila melanogaster
dTNP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	lange doppelsträngige RNA
ECL	enhanced chemoluminescence
ETO	eight twenty one
FAB	French American British Group
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FSC	forward scatter
FMR1	fragile X mental retardation 1

hnRNPK	heteronukleäres Ribonukleoprotein K
kDa	Kilodalton
KH	K-homolog
LSM	Laserrastermikroskopie
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MLL	mixed lineage leukemia
mRNA	messenger RNA
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ncRNA	nicht kodierende RNA
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
nt	Nukleotid
PBS	phosphate buffered saline
PBMC	periphere mononukleäre Zellen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PML	Promyelozytenleukämie
PI	Propidiumiodid
r15-LOX	reticulocyte 15 Lipoxygenase
RAR α	retinoic acid receptor alpha
RNA	Ribonukleinsäure
RRM	RNA-Erkennungsmotiv
SCP160p	Saccharomyces cerevisiae
SDS	sodium dodecyl sulfate
siRNA	small interfering RNA
SSC	sideward scatter

Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris Borat EDTA Puffer
TBST	Tris buffered saline mit Triton X
tRNA	Transfer RNA
tRNP	tRNA bindender Ribonukleoproteinkomplex
WHO	World Health Organization
WST	water soluble tetrazolium
WST1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio] -1,3-Benzol-Disulfonat
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Leukämien sind maligne systemische Erkrankungen der Myelo- oder Lymphopoese. Nach ihrem klinischen Verlauf kann man sie in eine akute und chronische Form einteilen, und, je nach beteiligter Zellpopulation, in myeloisch und lymphatisch. Die chronische lymphatische Leukämie (CLL), welche zu den indolenten Lymphomen gehört, kann über Jahre nicht behandlungsbedürftig sein. Dem gegenüber steht die, zu den myeloproliferativen Syndromen zugehörige, chronische myeloische Leukämie (CML).

Die akute lymphatische und myeloische Leukämie (ALL/AML) bedürfen umgehender zytostatischer Therapie, da sie unbehandelt schon nach wenigen Wochen zum Tode führen können.

1.1 Akute myeloische Leukämien

Eine maligne klonale Entartung einer oder mehrerer Zellreihen der Hämatopoese kann zu einer akuten myeloischen Leukämie führen. Die Inzidenz der AML in Deutschland beträgt 3,1 Fälle pro 100.000 Einwohner und steigt mit Zunahme des Lebensalters an (Nennecke et al., 2014). Bei den über 70-Jährigen beträgt die Erkrankungshäufigkeit ca. 100 Fälle pro 100.000 Einwohner (Juliussen et al., 2009). Risikofaktoren für die Entstehung einer AML sind Benzole, Tabak (Musselman et al., 2013), Zytostatika und radioaktive Strahlung. Hierbei zeigt sich eine Häufung der AML nach einer Therapie mit Alkylanzien mit Beginn nach ca. 4 bis 6 Jahren nach Exposition und nach Topoisomerase-II-Hemmern mit Beginn nach ca. 1 bis 3 Jahren. Diese können mit typischen genetischen Aberrationen einhergehen. Man unterscheidet *de novo* AML-Formen von der sekundären AML, welcher in einigen Fällen ein myelodysplastisches Syndrom vorausgehen kann (Weinberg et al., 2009).

Die Einteilung der AML erfolgt nach morphologischen, zytogenetischen und molekularbiologischen Aspekten, welche in der WHO-Klassifikation zusammengefasst sind (Kuriyama, 2009). Die morphologische Einteilung erfolgt gemäß der French-American-British-Group (FAB) und ist in Tabelle 1 dargestellt. Eine Übersicht zur WHO-Einteilung zeigt Tabelle 2. Aus dieser gemeinsamen Einteilung kann die Prognose eingeschätzt werden, was aus der rein morphologischen Einteilung gemäß der FAB-Klassifikation nicht möglich ist.

Tabelle 1 FAB Klassifikation der AML (Freund, 2008)

FAB-Nomen	Zytomorphologie
M0	AML mit minimaler myeloischer Differenzierung
M1	AML ohne morphologische Ausreifung
M2	AML mit morphologischer Ausreifung
M3	Promyelozytenleukämie
M3var	Variante Form der Promyelozytenleukämie (feingranuläre Form)
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie
M4eo	Akute myelomonozytäre Leukämie mit abnormen Eosinophilen
M5a	Akute Monoblastenleukämie
M5b	Akute Monozytenleukämie
M6a	Erythroleukämie, erythroid-myeloid
M6b	Erythroleukämie, rein erythroid
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie

Tabelle 2 WHO-Klassifikation der AML (Freund, 2008)

Hauptgruppe	Subtypen
Akute myeloische Leukämie mit definierten genetischen Aberrationen	<ul style="list-style-type: none"> >AML mit t(8;21)(q22;q22) (AML1/ETO) >AML mit abnormen Eosinophilen inv(16)(p13;q22) oder t(16;16)(p13;q22) (CBFβ/MYH11) >Akute Promyelozytenleukämie t(15;17)(q22;q12) (PML/RARα) und Varianten >AML mit 11q23 (MLL) Aberrationen
Akute myeloische Leukämie mit multiliniärer Dysplasie	<ul style="list-style-type: none"> >Nach Myelodysplasie oder Myelodysplasie/myeloproliferativer Erkrankung >Ohne vorhergehende Myelodysplasie
Therapiebedingte akute myeloische Leukämie und MDS	<ul style="list-style-type: none"> >nach Alkylantien >nach Topoisomerase-II-Inhibitoren (auch lymphatisch) >andere
Akute myeloische Leukämie, nicht anders klassifiziert	<ul style="list-style-type: none"> >FAB M0 bis M7 >Akute Basophilenleukämie >Akute Panmyelose mit Myelofibrose >Myelosarkom
Akute Leukämien ohne eindeutige Linienzuordnung	<ul style="list-style-type: none"> >undifferenzierte akute Leukämie >Biliniäre akute Leukämie >Biphänotypische akute Leukämie

Einige der genetischen bzw. molekularbiologischen Veränderungen gehen mit einem typischen klinischen Verlauf und variabler Prognose der Erkrankung einher.

AML mit t(8;21)(q22;q22) AML1-Eto FAB M2

Patienten mit dieser Aberration sind meistens jünger und zeigen häufig eine Splenomegalie. Eine extramedulläre Tumormasse oder einen ZNS-Befall haben etwa 20% der Patienten. Sie zeigt ein gutes Ansprechen auf Cytosin-Arabinosid. Insgesamt ist die Prognose dieser Form der AML als günstig einzustufen (Cho et al., 2003).

AML mit inv(16)(p13;q22) / t(16;16)(p13;q22) FAB M4Eo

Ungefähr 10-12% aller AML zeigen eine Inversion 16. Sie findet sich vorwiegend bei jüngeren Patienten und kann sich selten in Form eines Myelosarkoms äußern. Auch diese Aberration hat eine günstige Prognose wenn aggressiv mit hochdosiertem Cytosinarabinosid behandelt wird (Pulsoni et al., 2008).

AML mit t(15;17)(q22;q12) und variante PML-RAR α FAB M3/v

Diese Form der AML zeigt sich bei Patienten mittleren Alters und macht ca. 5-8% aller AML aus. Klinisch kann sich eine ausgeprägte Verbrauchskoagulopathie mit massiver Blutungsneigung zeigen. Die variante Form zeigt zudem eine Hyperleukozytose. Insgesamt hat diese AML eine günstige Prognose wenn sie mit all-trans-Retinolsäure (ATRA) und Anthrazyklinen behandelt wird (Freund, 2008).

AML mit 11q23 (MLL-Aberration) FAB M5

Die üblicherweise monozytär differenzierte AML mit MLL-Aberration imponiert klinisch mit Chlorombildung und gelegentlich auch mit der Ausbildung einer disseminierten intravasalen Gerinnung. Bei Erwachsenen ist die Prognose insgesamt schlecht, wobei die t(9;11) im Vergleich zu anderen 11q23-Translokationen, einen günstigeren Verlauf zeigt (Fuchs and Staib, 2010).

Ohne eine suffiziente Therapie, die aus einer Polychemotherapie und/oder einer allogenen Blutstammzelltransplantation bestehen kann, führt der natürliche Verlauf der AML bei 50% der Patienten nach 5 Monaten und bei allen Patienten nach einem Jahr zum Tode (Southam et al., 1951).

1.2 Das Multi-KH-Domänenprotein Vigilin

Gesunde Zellen unterliegen einer genetisch gesteuerten Regulation ihrer Differenzierung, Proliferation und Apoptose. Durch Verlust regulatorischer Gene, hier Tumorsuppressorgene, können Onkogene entstehen, welche die normale Regulation außer Kraft setzen und somit die Karzinogenese und das Entstehen von malignen Zellen begünstigen (Califano et al., 1996). Während des gesamten Prozesses der Transkription, Translation und Prozessierung kann die Genexpression und somit auch die Aktivität der betreffenden Zelle durch multiple Faktoren reguliert werden. Dazu gehören auch RNA-bindende Proteine, welche durch Bindung an die entsprechende Domäne, durch z.B. das Zink-Finger-Motiv oder das RNA-Erkennungsmotiv (RRM) Interaktionen auslösen können (Darnell, 2013). Durch Bindung an die zytoplasmatische mRNA kann diese degradiert werden und somit Einfluss auf endonukleäre Enzyme haben (Dodson and Shapiro, 2002). In einigen dieser RNA-bindenden Proteine findet man charakteristische KH-Domänen, welche erstmalig im heteronukleären Ribonukleoprotein K (hnRNP K) nachgewiesen wurden (Gibson et al., 1993; Siomi et al., 1993).

Das aus ca. 60 Aminosäuren aufgebaute KH-Motiv (K-homologe Domäne des hnRNP K) imponiert mit einer β - α - α - β - β - α Sekundärstruktur. Eine C-terminale Helix stabilisiert diese Verbindung, ist aber nicht bei allen KH-Motiven zu finden (Castiglione Morelli et al., 1995). Die Interaktion mit der RNA findet an der helikalen Seite der Domäne statt (Musco et al., 1996). Die hnRNP sind vielfach in Zellkernen vertreten, wobei das hnRNP K und J eine Sonderstellung hinsichtlich ihrer Bindungsspezifität einnehmen (Matunis et al., 1992). Ihre Hauptaufgabe liegt im Transport und der Strukturierung der mRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma (Siomi and Dreyfuss, 1997). Spätere Untersuchungen zeigten, dass sie auch maßgeblich am Transport der tRNA in Zellen mit hoher Proteinsynthese-Leistung beteiligt sind (Kruse et al., 2000).

Bis heute wurden zahlreiche Proteine mit KH-Domänen beschrieben und ihre klinische Relevanz evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass das hnRNP K eine Schlüsselrolle in der Differenzierung der Erythrozyten während der Erythropoese einnimmt. Durch Bindung an die reticulocyte 15-lipoxygenase (r15-LOX)-mRNA verhindert es die Initiierung der Translation dieses für die mitochondriale Degradierung und somit Differenzierung der erythrozytären Vorläuferzelle wichtigen

Enzyms (Naarmann-de Vries et al., 2013). Eine noch nicht vollständig geklärte Rolle in der Genese verschiedener Erkrankungen beim Menschen, zeigen Untersuchungen des hnRNP K Sam68 an Mäusen. Erste Ergebnisse lassen auf eine Korrelation der Expression von Sam68 mit Osteoporose, Krebs und Infertilität schließen (Richard, 2010). Dem gegenüber bekannt ist die klinische Bedeutsamkeit der KH-Domäne im FMR1-Protein, welches bei Fehlen der Expression oder auch beim Vorliegen einer Punktmutation (Ile304 →Asn) zu dem vererbbaeren Fragilen-X-Syndrom, eine Erkrankung mit ausgeprägter Intelligenzminderung und auch Sprachstörungen, führen kann (De Boulle et al., 1993; Siomi et al., 1994).

Das mit einer Molekülmasse von 150 kDa ubiquitär vorkommende Vigilin nimmt unter den KH-Domänen-Proteinen eine Sonderstellung ein. Das kodierende Gen befindet sich beim Menschen auf Chromosom 2. Anstelle von nur 3 KH-Domänen besitzt Vigilin 14 homologe Domänen und eine degradierte KH-Domäne (Kugler et al., 1996). Die homologen Domänen bestehen aus 44 bis 48 Aminosäuren, wobei die degradierte Domäne hochkonserviert ist und aus einer gegenläufigen α -Helix besteht (Neu-Yilik et al., 1993). Die Erstbeschreibung und komplette Sequenzierung der cDNA erfolgte erstmals in Hühnerchondrozyten (Schmidt et al., 1992). Vigilin konnte in vielen Geweben nachgewiesen werden, wobei dessen Expression starken Schwankungen, abhängig vom jeweilige Gewebetyp, unterliegt (Neu-Yilik et al., 1993). Wie schon gezeigt, konnte es in gesunden und neoplastischen Säugerzellen, und in Hühnerchondrozyten nachgewiesen werden; zudem in Zellen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Scp160p) und in *Drosophila melanogaster* (DDP1) (Cortés et al., 1999; Wintersberger et al., 1995).

Das Vorkommen von Vigilin ist in Abbildung 1 dargestellt. Neuere Untersuchungen zeigten eine deutliche Expression von Vigilin - eine damit eventuell zentrale Rolle einnehmend - in Zellen des hepatozellulären Karzinoms und in Brustkrebszellen (Duan et al., 2011; Woo et al., 2011). Außerdem konnte es in Verbindung mit Signalpeptidpeptidasen gebracht werden, was die Rolle des Vigilins bei der posttranslationalen Prozessierung unterstreicht (Lu et al., 2012).

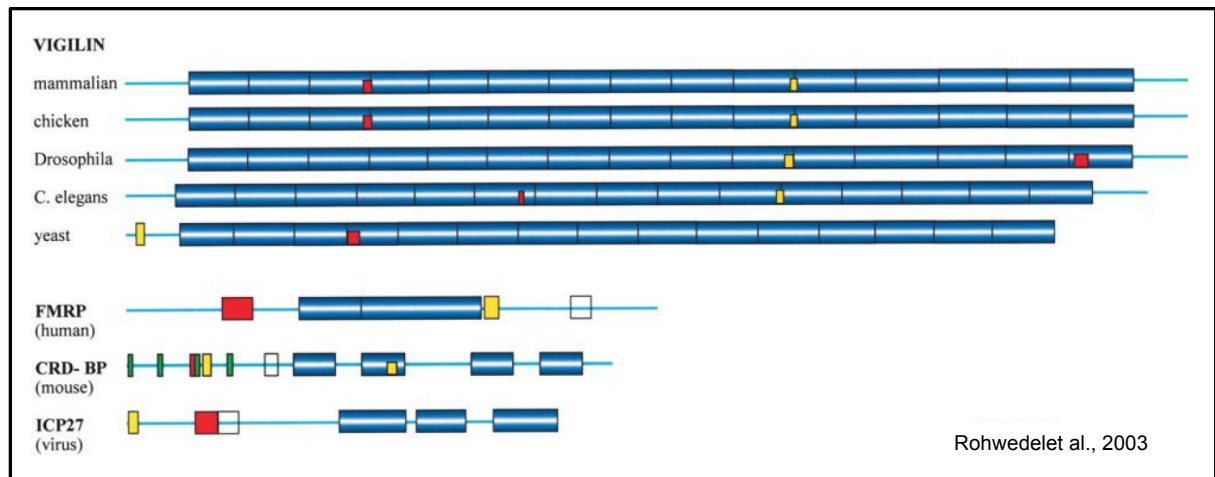


Abbildung 1 *Vigilin in verschiedenen Spezies*

Die Abbildung zeigt typische Vertreter der KH-Domänen-Familie. Oben ist die Sequenz des Vigilin in verschiedenen Spezies dargestellt. Darunter werden drei weitere Vertreter der KH-Domänen-Familie gezeigt. Das FMRP (humane fragile X-mentale-Retardationsprotein, CRDBP (Coding-Region-Determinant-Binding-Protein der Maus) und ICP27 (Herpes simplex Virus infizierendes Zell-Polypeptid 27. **Blau:** KH-Domäne, **rot:** NLS, **gelb:** NES, **weiß:** RGG-Motiv, **grün:** Ribonukleoproteinmotiv.

Da das KH-Motiv des Vigilins im Zellkern und im Zytoplasma nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass Vigilin eine wichtige Rolle beim Transport der RNA einnimmt. Der Nachweis einer Kernexportsequenz zwischen den Domänen 10 und 11 und einer Kernlokalisierungssequenz zwischen den Domänen 3 und 4 unterstreicht diese Annahme (Kugler et al., 1996). Später konnte gezeigt werden, dass Vigilin zusammen mit Elongationsfaktor 1 α und tRNA einen tRNA-bindenden Ribonukleoproteinkomplex (tRNP) bildet, welcher im Zellkern und im Zytoplasma nachgewiesen werden konnte (Kruse et al., 1998). Vigilin konnte in Zellen mit hoher Proteinsyntheseleistung und damit verbundener erhöhter Translationsaktivität und erhöhtem Bedarf an Protein mit einer vermehrten Expression nachgewiesen werden (Hilgendorf et al., 2001). Dieser Prozess wird durch die Bindung an den tRNP vermittelt (Schuh et al., 2003). Dies ist in Abbildung 2 dargestellt. Ebenso kann vermutet werden, dass Vigilin eine wichtige Rolle bei zellulären Aktivierungsvorgängen spielt (Neu-Yilik et al., 1993).

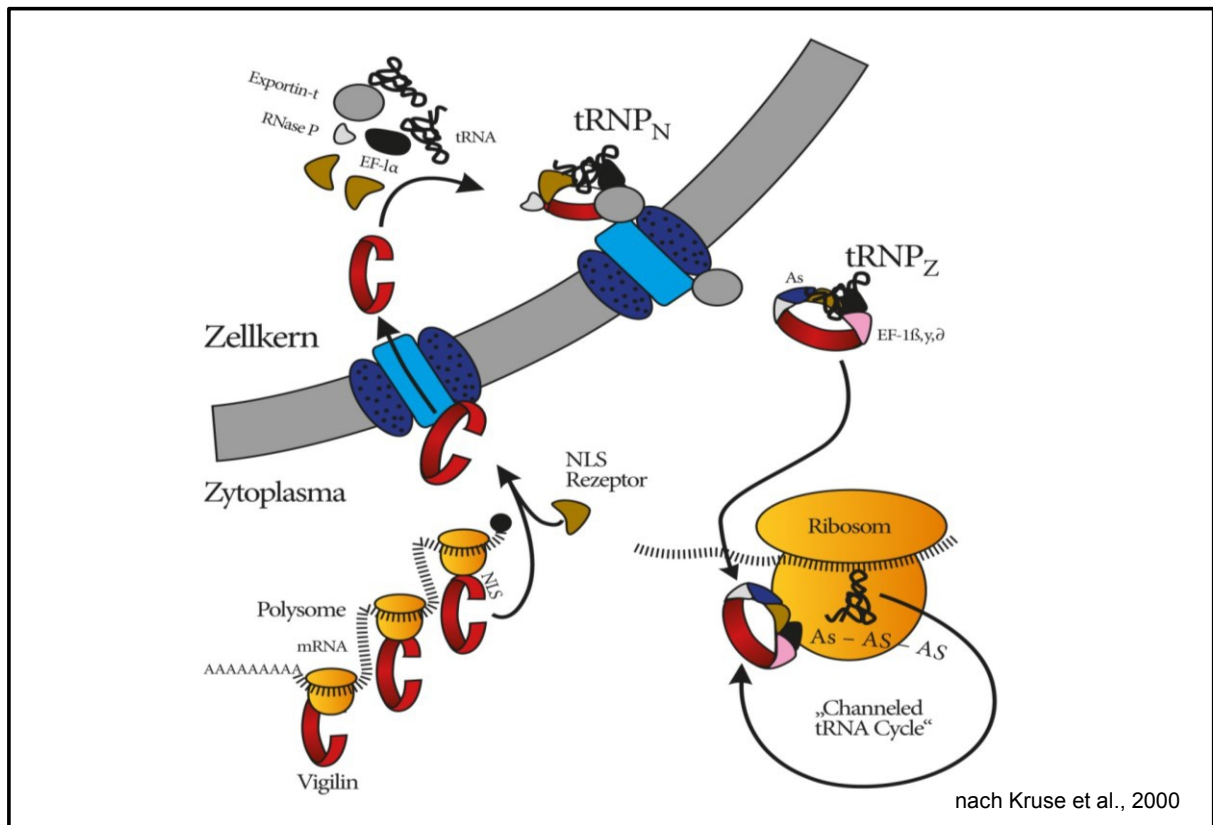


Abbildung 2 Vigilin im RNA-Transportzyklus

Zum Durchtritt in das Kernplasma bindet Vigilin mit der Kernlokalisierungssequenz (NLS) an den NLS-Rezeptor, bestehend aus Importin α und Importin β . Nach Ablösen des NLS-Rezeptor vom Vigilin im Zellkern, bindet dieses an Elongationsfaktor-1 α (EF-1 α), Exportin-t, tRNA und weitere unbekannte Faktoren und bilden den nukleären Ribonukleoproteinkomplex (tRNP_N). Nach Durchtritt durch die Kernpore ins Zytoplasma löst sich Exportin-t und es binden Translationsfaktoren (EF 1 β , γ und δ) und bilden somit den zytoplasmatischen Ribonukleoproteinkomplex (tRNP_Z). Dieser bindet an das Ribosom um so die Proteinsynthese einleiten zu können.

Im Vigilingen des Menschen konnten zwei unterschiedliche mRNA, Vig-1A und Vig-1B, nachgewiesen werden. Diese entstehen durch alternatives Spleißen der Exone 1A und 1B (siehe Abbildung 3). Das humane Exon 1C ist dem Exon 1 des Hühner-Vigilins identisch (Kugler et al., 1996). Untersuchungen zeigten, dass ein für 13 Aminosäuren kodierender Leserahmen im Exon 1A die Proteinsynthese des Vigilins unterdrückt (Rohwedel et al., 2003).

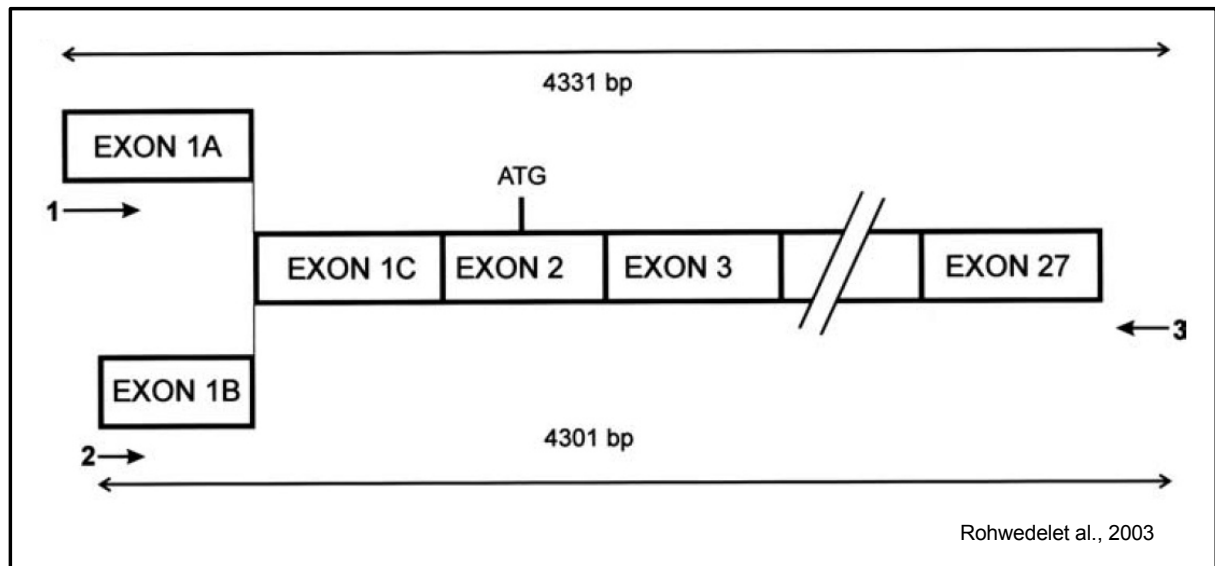


Abbildung 3 Exonstruktur des humanen Vigilins

Das humane Vigilin zeigt zwei Spleißvarianten mit den beiden alternativen Exons Exon 1A und Exon 1B. Die Vig-1A mRNA besitzt 4331 bp und die Vig-1B mRNA 4301 bp. Exon 1C ist homolog zum Exon 1 des Hühner-Vigilin. Das Startkodon ATG für das Vigilin-Protein befindet sich auf Exon 2.

In verschiedenen Tumorzelllinien wurde gezeigt, dass eine Hemmung der Vigilinexpression die zelluläre Aktivität reduziert oder zur Induktion von Apoptose führte. Durch Vigilin-Antisense-Oligo-DNA (VAOD) und der damit verbundenen Hemmung der Vigilinsynthese konnte in humanen Larynxkarzinomzellen der Zelllinie Hep2 eine Reduktion der Cytokeratinsynthese um 40% erreicht werden (Schuh et al., 2003). In der Zervixkarzinomzelllinie HeLa konnte durch Transfektion mittels siRNA eine Ausschaltung von Vigilin erzeugt und Apoptose induziert werden (Goolsby and Shapiro, 2003). Im Gegensatz dazu zeigten jüngere Untersuchungen an Brustkrebszelllinien, dass eine verminderte Vigilinsynthese auch die Zellproliferation steigern kann (Woo et al., 2011).

Aufgrund der hier genannten Daten könnte Vigilin als ein mögliches therapeutisches Zielprotein zur Behandlung maligner Erkrankungen dienen. Durch gezieltes Ausschalten bzw. Beeinflussung der Regulation der Vigilinaktivität könnten Zellen, die von einer hohen Proteinsyntheserate bei erhöhter Proliferation abhängig sind, in ihrem Wachstum und ihrer Invasivität gehemmt werden.

1.3 RNA-Interferenz

Durch RNA-Interferenz ist es möglich, gezielt spezifische Gene auszuschalten (Waterhouse et al., 2001a). Es wird vermutet, dass dies ein evolutionär bedingter natürlicher Prozess ist, um das Genom der Zelle vor Einbringung eventuell schädlicher Nukleinsäuren, zum Beispiel durch Viren, zu schützen (Tabara et al., 1999; Waterhouse et al., 2001b). Durch Einschleusen doppelsträngiger RNA (dsRNA) wird der Abbau der komplementären mRNA induziert und somit das Zielgen ausgeschaltet. Dieser Vorgang konnte erstmals durch Fire und Mello 1998 nachgewiesen werden (Fire et al., 1998). Später wurde bekannt, dass dieser natürliche Prozess nicht nur in Pilzen und Pflanzen, sondern auch in Protozoen und Wirbeltieren vorkommt (Caplen et al., 2001; Fire, 1999). Eine schematische Darstellung des Prozesses der RNA-Interferenz ist in Abbildung 4 zu sehen.

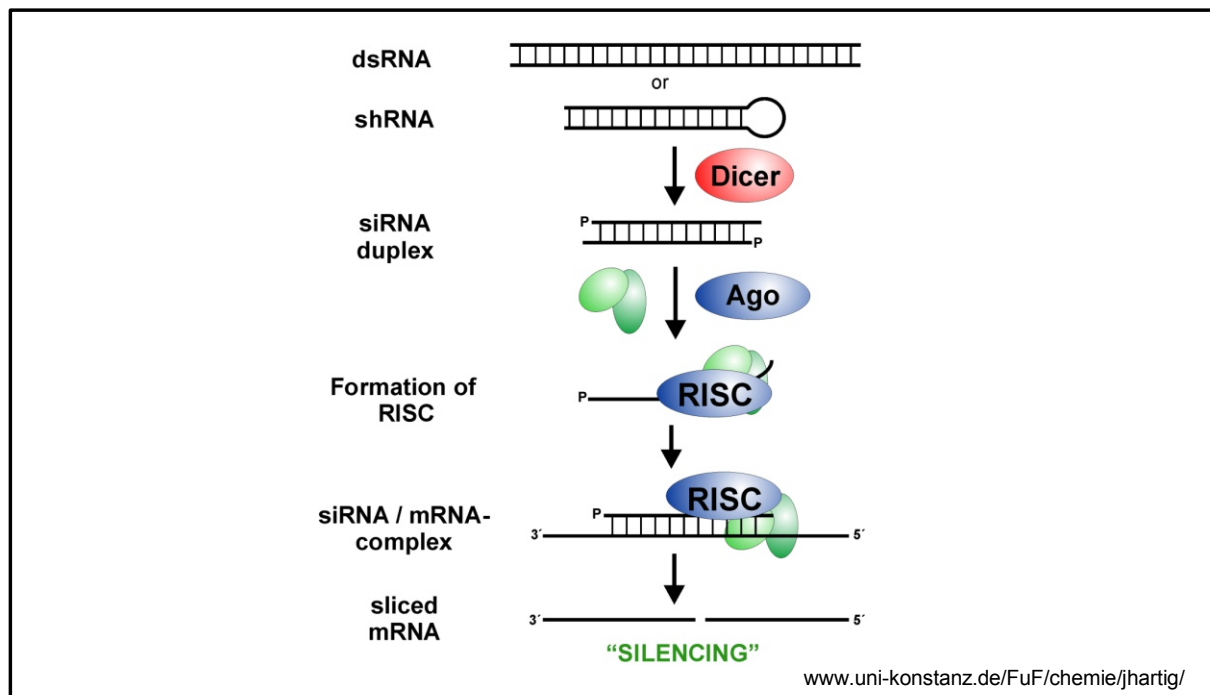


Abbildung 4 Genregulation durch RNA-Interferenz

Die doppelsträngigen RNA-Moleküle (dsRNA) werden vom Dicer in ca 20 bis 25 bp große doppelsträngige RNA - Fragmente zerlegt (siRNA). Nach Bindung an den RNA induced silencing complex (RISC) wird dieses Protein zur mRNA transportiert, wo es mit dem antisense-Strang über komplementäre Basenpaarung an die mRNA bindet und so die Degradierung dieser ausgelöst wird.

Die in die Zielzelle eingebrachte dsRNA wird durch endogene Dicer in 20 bis 25 nt große Fragmente gespalten, welche ab diesem Zeitpunkt short interfering RNA (siRNA) genannt werden. Diese Fragmente werden an den RNA induced silencing complex (RISC) gebunden, welcher durch seine endogene Nukleaseaktivität bedingt, den siRNA-Strang in seine Einzelstränge aufteilt. Im RISC enthalten sind sogenannte Argonauten-Proteine, dessen genaue Rolle noch nicht vollständig geklärt ist (Cai et al., 2012). Der mit dem Proteinkomplex verbundene Antisense-Strang wird mittels der komplementären Basenbindung an die entsprechende mRNA angeheftet, woraufhin die Slicer RNase, die ebenfalls am RISC gebunden ist, die mRNA in der Mitte des durch die siRNA überspannten Areals spaltet (Bernstein et al., 2001). Der gesamte Vorgang der RNA-Interferenz ist in seiner Komplexität noch nicht vollständig geklärt. Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass der zentrale Schauplatz der RNA-Interferenz das raue endoplasmatische Retikulum ist (Stalder et al., 2013). Der endogene ATP-abhängige Prozess wird energetisch wahrscheinlich durch die Chaperon-Maschinerie der heat-shock-cognate-protein 70 (Hsc70)/heat-shock-protein 90 (Hsp90) reguliert (Iwasaki et al., 2010). Bei der Auswahl des optimalen Antisense-Stranges greifen wahrscheinlich RNA-bindende Proteine (TRBP) und Protein-Aktivatoren (PACT) während der Bindung der dsRNA an den RISC ein (Noland and Doudna, 2013).

Da siRNA hochspezifisch an die mRNA des Zielgens bindet und diese ausschaltet, eignet sie sich hervorragend zur Untersuchung der Bedeutung von Genen und deren Hoch- bzw. Herunterregulierung. Dies ist mittlerweile möglich, da synthetisch hergestellte siRNA-Moleküle und effiziente Transfektionsmethoden zur Verfügung stehen.

1.4 Zielstellung

Es ist bekannt, dass Vigilin in Zellen mit erhöhter Proteinsyntheseleistung und/oder erhöhter Proliferationsrate vermehrt exprimiert wird. Anhand dieser Arbeit soll erstmals die Expression von Vigilin in Zellen der akuten myeloischen Leukämie untersucht werden. Die Analysen sollen dabei sowohl an Zelllinien als auch an *de novo*-AML-Blasten durchgeführt werden. Zusätzlich erfolgt eine funktionelle Prüfung des Vigilins hinsichtlich dessen Einfluss auf die Proliferation und des Metabolismus der AML-Blasten durch RNA-Interferenz. Wie schon erwähnt zeigen neuere Untersuchungen an Zellen des Hepatozellulären Karzinoms und des Zervix-Karzinoms eine höhere Vigilinexpression als Zellen in gesunden Geweben (Duan et al., 2011). Eine Hemmung dieser Überexpression könnte zu einer gezielten Ausschaltung bzw. Proliferationshemmung der Tumorzellen führen. Es sollen somit Daten gesammelt werden, die das Potential des Vigilins als mögliches therapeutisches Zielprotein zur Hemmung der Proliferation untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten an den Zelllinien und an den *de novo*-Zellen wurden an einer sterilen Werkbank und unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C unter einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂. Alle Medien und Zusätze wurden vor Verwendung auf 37 °C erwärmt.

2

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig (DSMZ) bezogen.

2.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien

HL60 (DSM Acc 3)

Es handelt sich bei dieser Zellkultur um Zellen einer akuten myeloischen Leukämie FAB M2. Diese wurden von einer 23-jährigen Frau isoliert. Immunphänotypisch sind die Zellen wie folgt charakterisiert: CD3 neg., CD4 pos., CD13 pos., CD14 neg., CD15 pos., CD19 neg., CD33 pos., CD34 neg., HLA-DR neg. . Es liegt ein komplex aberranter Karyotyp vor.

82-88<4n>XX, -X, -X, -8, -8, -16, -17, -17, +18, +22, +2mar, ins(1;8)(p?31;q24hsr)x2, der(5)t(5;17)(q11;q11)x2, add(6)(q27)x2, der(9)del(9)(p13)t(9;14)(q?22;q?22)x2, der(14)t(9;14)(q?22;q?22)x2, der(16)t(16;17)(q22;q22)x1-2, add(18)(q21)

Das Kulturmedium bestand aus 90% RPMI 1640 + 10% FKS + 1% Penicilin und Streptomycin.

NB4 (DSM Acc 207)

Diese Zelllinie einer Promyelozytenleukämie (FAB M3) wurde von einer 23-jährigen Frau im zweiten Rezidiv 1989 isoliert. Sie tragen die für das PML-RAR α -Fusionsgen verantwortliche Translokation t(15;17) (Duprez et al., 1992; Lanotte et al., 1991). Die Zellen sind hypertriploid mit 3% Polyploidie. Der Immunphänotyp ist wie folgt angegeben: CD3 neg., CD4 pos., CD11b neg., CD13 pos., CD14 neg., CD15 pos., CD19 neg., CD33 pos., CD34 neg., CD38 pos., HLA-DR neg.. Hier ist ebenfalls ein komplex aberranter Karyotyp vorliegend.

78(71-81)<3n>XX, -X, +2, +6, +7, +7, +11, +12, +13, +14, +17, -19, +20, +4mar,
der(8)t(8;?)(q24;?),der(11)t(11;?)(?->::11p15->11q22.1::11q13->22.1:),
der(12)t(12;?)(p11;?), 14p+, t(15;17)(q22;q11-12.1), der(19)t(10;19)(q21.1;p13.3)x2.

Das Kulturmedium bestand aus 90% RPMI 1640 + 10% FKS + 1% Penicilin und Streptomycin.

HEp2

Es handelt sich hier um eine humane Larynxkarzinom-Zelllinie, die durch eine Kontamination mit einer HeLa-Zelllinie etabliert wurde (Nelson-Rees et al., 1981). Die adhärent wachsenden Zellen wurden mit DMEM, 10% FKS und 1% Aminosäuren und 1% Penicillin und Streptomycin kultiviert. Bei bekannter hoher Vigilinexpression der HEp2-Zelllinie diente dieser als interner Standard und die Proteinlysate wurden beim Western Blot als Positiv-Kontrolle mitgeführt.

2.1.2 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC)

Vor Entnahme im Rahmen der Routineblutentnahme gaben alle Patienten ihr Einverständnis zur wissenschaftlichen Untersuchung ihres Blutes. Patientencharakteristika sind in Tabelle 3 dargestellt. Anzumerken ist, dass auch ein Patient mit einem leukämisch verlaufenden B-Zell Lymphom mit untersucht wurde, da er initial als AML gemeldet worden war. Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen entnommen und innerhalb von 2 Stunden aufgearbeitet. Die Zellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation separiert.

Die Dichtegradientenzentrifugation wurde genutzt um mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut zu gewinnen (PBMC). Als Zellseparationsmedium wurde Biocoll verwendet. Das Blut wurde mit PBS 1:2 verdünnt und dann auf das Biocoll geschichtet, ohne eine Vermischung der Phasen zu verursachen. Dieser Ansatz wurde ungebremst bei 1200 x g für 12 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Methode liegt die Bildung eines Stufengradienten zugrunde. Biocoll hat eine Dichte von 1,077 g/ml. Da die zellulären Bestandteile des Blutes wie Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten eine geringere Dichte als Biocoll haben, bilden sie nach der Zentrifugation eine getrennte Schicht auf dem Separationsmedium. Erythrozyten und polymorphkernige Leukozyten haben eine größere Dichte und wandern daher durch das Biocoll und bilden ein Pellet am Boden des Röhrchens. Die mononukleären Zellen konzentrieren sich als Ring zwischen dem Plasma und dem

Separationsmedium (Alfred Pingoud, 1999). Die mononukleären Zellen wurden abpipettiert und anschließend zwei Mal in PBS bei 400 x g für 10 Minuten bei 4 °C gewaschen. Zeigte sich nach diesen Waschschr⁴itten noch das Vorhandensein von Erythrozyten (rötliche Verfärbung der Pellets) wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Dazu wurde das Pellet in 15 ml NH₄Cl (0,25 M) gelöst und für 10 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 400 x g und 4 °C für 12 Minuten wurde das Pellet erneut in PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 2.1.4). Die *de novo* AML-Zellen aus dem Blut der Patienten wurde bis zur Verwendung viabel eingefroren (siehe Abschnitt 2.1.5.).

Tabelle 3 de novo-AML und deren Charakteristika

Patient	Alter	FAB	Zytogenetischer Befund
P1	57	M1	46,XX
P2	79	n.a.	n.a.
P3	64	M1	46,XY[1]/47,XY, +13[9]
P4	40	M2	46,XY[2]/45,X,-Y, t(8;21)(q22;q22),del(9)(q13q22)[6]
P5	19	M4	del(3q26)
P6	82	Leukämisch verlaufendes niedrigmalignes B-Zell Lymphom	
P7	69	M2	47,XX,+8[11]
P8	79	M4	n.a.
P9	51	M2	46,XX
P10	81	M1	46,XY[21]/46,XY,+der(1)t(1;14)(q10;p10), -14[4]
P11	68	M4eo	46,XY, t(8;21)(q22;q22)(10).nuc ish 8q22(ETOx3),21q22(AML1x3)(ETO con AML-1x2)
P12	86	M4	46,XX[16]
P13	79	M2	46,XY[17]
P14	49	M3	46,XY, t(15;17)(q22;q21)[6]/46,XY[1].nuc ish 15q22(PMLx2),17q21.1(RARax2)(PML con RARax1)

2.1.3 Einstellung der Zellzahl und Bestimmung der Vitalität

Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen wurde Trypanblau verwendet. Dieser Farbstoff markiert nur abgestorbene Zellen bzw. Zellen mit einer perforierten Zellmembran. Sowohl Zytoplasma als auch Zellkern werden blau gefärbt, während lebende Zellen, die den Farbstoff nicht aufnehmen, unter dem Lichtmikroskop hell leuchtend erscheinen. Die Zellen werden mit Trypanblau (0,04 % in PBS) verdünnt und anschließend 10 µl dieser Lösung in die Neubauerzählkammer pipettiert.

2.1.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Zelllinien und die PBMC wurden bei - 80 °C kryokonserviert. Dazu wurden 1 x 10⁶ Zellen in einem 18% volumenäquivalenten Gemisch aus DMSO/HSA mit einem Gesamtvolumen von 1 ml eingefroren. Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut. Danach wurde die Zellsuspension in 10 bis 20 ml vorgewärmten RPMI Medium zwei Mal bei 200 x g für je 5 Minuten gewaschen. Danach erfolgte eine Zählung und Bestimmung der Vitalität der Zellen mittels Trypanblau. Nach Aufnahme in das Nährmedium wurden die Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen kultiviert.

2.2 Transfektion von AML-Zelllinien mit small interfering RNA (siRNA)

Die hier genutzten siRNA-Moleküle wurden als Lyophilisate von der Firma Qiagen bezogen. Eine mit dem Farbstoff Alexa Fluor 488 nm markierte siRNA diente zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und gleichzeitig als Negativkontrolle. Die Vigilin spezifische siRNA wurde nach Goolsby und Shapiro von der Firma Qiagen synthetisiert (Goolsby and Shapiro, 2003). Die Bindung erfolgt durch den Antisense Strang zwischen den Nukleotiden 506 und 524 für Vig1, sowie zwischen 912 und 930 für Vig2 der humanen Vigilin mRNA. Die lyophilisierte siRNA wurde im Suspensionspuffer gelöst, sodass eine Stammlösung von 20 µM vorlag. Anschließend wurde die Lösung durch auf 90 °C für eine Minute erhitzt und danach bei 37 °C für 60 Minuten inkubiert. Die Lagerung erfolgte dann bei - 20 °C.

Die genutzten siRNA-Moleküle wiesen folgende Nukleotidsequenz auf:

Vigilin siRNA (nach (Goolsby and Shapiro, 2003))

Vig1:

Sense ACC UCU CUU UGA CGU UCU G dTdT

Antisense UGG AGA GAA ACU GCA AGA C dTdT

Vig2:

Sense: UCC CAA CAC AAG UAU GUC A dTdT

Antisense: UGA CAU ACU UGU GUU GGG A dTdT

Negativkontrolle: siRNA (Qiagen)

Sense: UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdT dT

Antisense: ACG UGA CAC GUU CGG AGA AdT dT

Alexa Fluor 488 am 3`-Ende des sense Stranges

2.3 Transfektion mittels Elektroporation

Die Methode der Wahl zur Transfektion der Zellen wurde aus Vorversuchen mit verschiedenen Transfektionsmethoden ermittelt (Schult, 2008) und eine Transfektion über Elektroporation als methodischer Ansatz gewählt. Bei dieser Methode wird mittels eines elektrischen Impulses die Permeabilität der Zellmembran temporär erhöht, damit die eingesetzte siRNA in die Zielzelle eindringen kann.

Die Zellen wurden vor der Elektroporation in RPMI 1640 ohne Zusätze bei 180 x g und 10 °C für 10 Minuten zweimal gewaschen. Es wurden 1×10^7 Zellen in 300 µl Medium ohne Zusätze eingesetzt. In die vorgekühlte Elektroporationsküvette wurden 25 µg siRNA vorgelegt (12,5 µg Vig1 siRNA und 12,5 µg Vig2 siRNA) und dann anschließend mit der Zellsuspension vorsichtig vermischt. Nach erfolgter Inkubation für 10 Minuten auf Eis wurden die Zellen bei einer Spannung von 300 mV und einer Kapazität von 960 µF im Gene Pulser von Biorad elektroporiert und danach erneut 10 Minuten auf Eis gekühlt. Im Anschluss wurde die Suspension in eine 6 Wellplatte überführt und für 6 Stunden in 8 ml Kompletmedium inkubiert. Nach 6 Stunden erfolgte eine Kontrolle der Transfektionseffizienz und die Zellen wurden zur weiteren Inkubation über 72 Stunden gleichmäßig auf 6 weitere Wells aufgeteilt.

2.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS) ist eine Methode zur qualitativen und quantitativen Untersuchung von Zellpopulationen hinsichtlich ihres Phänotyps, der Klonalität, des DNA-Gehalts und des Metabolismus. Dazu dienen physikalische Messmethoden, die um die Detektion über Fluoreszenzfarbstoffen erweitert wurde. Es ist hiermit möglich, sowohl intra- und extrazelluläre als auch endonukleäre Moleküle zu detektieren. Die Zellen werden durch eine Kapillare hintereinander an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Durch das dann entstehende Streulicht können Eigenschaften der Zelle bestimmt werden.

Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter FSC) gibt Angaben über die Größe der Zelle und das Seitwärtsstreulicht (sideward scatter SSC) gibt eine Einschätzung über die intrazellulären Bestandteile, wie z.B. die Granularität.

Wenn Fluoreszenzfarbstoffe an das zu untersuchende Material gebunden sind, werden diese durch die eintreffende Energie des Laserstrahls zur Emittierung eines für ihre Wellenlänge spezifischen Photonensignals angeregt. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Höhe des gemessenen Signals proportional zur Menge des gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes ist. Die gemessenen Signale werden dann anschließend von einem entsprechenden Programm ausgewertet und zu einer grafischen, in Histogrammen oder zweidimensional in dot plots, dargestellt. Die in dieser Arbeit genutzten Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Die FACS-Analysen wurden mit dem FACScan von Becton & Dickinson durchgeführt. Für die anschließende Auswertung der Daten wurde die Analysesoftware CellQuest v3.1.f genutzt.

Tabelle 4 Fluoreszenzfarbstoffe der Durchflusszytometrie

Fluoreszenzfarbstoff	Absorption (nm)	Emission (nm)	Fluoreszenzkanal
Alexa Fluor 488	495	519	FL-1
Annexin V FITC	495	519	FL-1
Propidiumiodid	536	617	FL-3

2.4.1 Bestimmung der siRNA Transfektionseffizienz

Um die Transfektionsrate der Zellen bestimmen zu können, wurden diese nach der entsprechenden Inkubationszeit geerntet und in PBS bei 180 x g für 10 Minuten bei 10 °C gewaschen. Das Pellet wurde abhängig von der zu erwartenden Zellzahl in 100 bis 500 µl PBS resuspendiert und die genaue Zellzahl in der Neubauerzählkammer bestimmt. Anschließend wurde im Durchflusszytometer die Transfektionseffizienz der Zellen unter Ausschluss von Zelldebris ermittelt (siehe Abbildung 5). Hierzu wurde der Anteil der grünfluoreszierenden Zellen nach Subtraktion der Eigenfluoreszenz bestimmt.

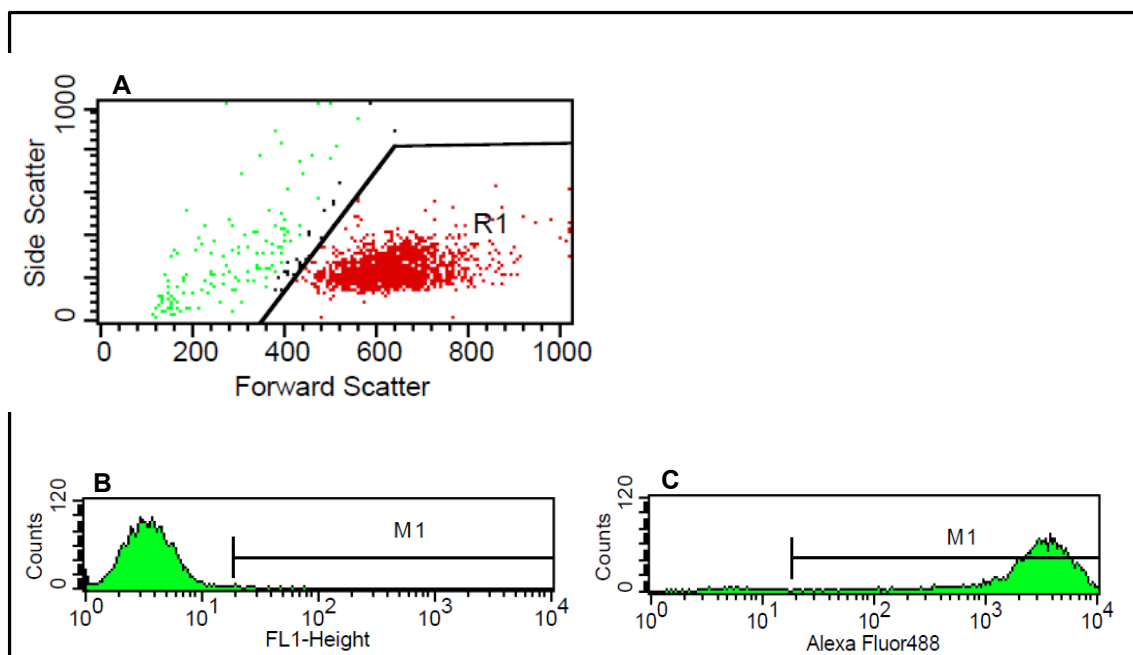


Abbildung 5 Bestimmung der Transfektionseffizienz

(A) Identifizierung der Zellpopulation im Forward und Sideward-Scatter (B) Bestimmung der Eigenfluoreszenz in der ausgewählten Zellpopulation (C). Anteil der grünfluoreszierenden Zellen unter Berücksichtigung der Eigenfluoreszenz.

2.4.2 Apoptosenachweis

Zur Differenzierung zwischen nekrotischen Zellen oder apoptotischen Zellen wurden Annexin V und Propidiumiodid (PI) genutzt. Annexin V ist ein zelluläres, kalziumabhängiges Protein, das hochspezifisch an Phosphatidylserine bindet (Andree et al., 1990; Tait et al., 1989). Es eignet sich als Markerprotein zum Nachweis apoptotischer Zellen (Koopman et al., 1994; Vermes et al., 1995). Zellen in der Initialphase der Apoptose kehren die membranständigen nach innen gerichteten Phosphatidylserine an die Außenseite der Polycholesterolschicht der Zellmembran (Verhoven et al., 1995; Zwaal and Schroit, 1997). Daher ist Annexin V sehr gut zum

Nachweis frühapoptotischer Zellen geeignet. Annexin V dringt jedoch auch in nekrotische Zellen ein und bindet an die nach innen gerichteten Phosphatidylserine. Aus diesem Grund wurde eine zweite Färbung mit Propidiumiodid durchgeführt, welches an DNA und DNA-Fragmente bindet (Conrad et al., 1999). PI kann nur durch defekte Zellmembranen diffundieren und markiert deshalb nur nekrotische Zellen. Da frühapoptotische Zellen noch eine intakte Zellmembran besitzen, werden diese nur von Annexin V markiert. Nekrotische und spätapoptotische Zellen sind im FACS für Annexin V und PI positiv.

Die Zellen wurden in 100 µl Annexin-Bindungspuffer aufgenommen und mit 5 µl Annexin V-FITC für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension mit 400 µl Annexin-Bindungspuffer verdünnt.

Unmittelbar vor der Messung erfolgte die Zugabe von 15 µl PI (0,6 µg/ml) um zwischen frühapoptotischen und spätapoptotischen und nekrotischen Zellen zu unterscheiden. In Abbildung 6 ist die Analyse anhand des dot plots dargestellt.

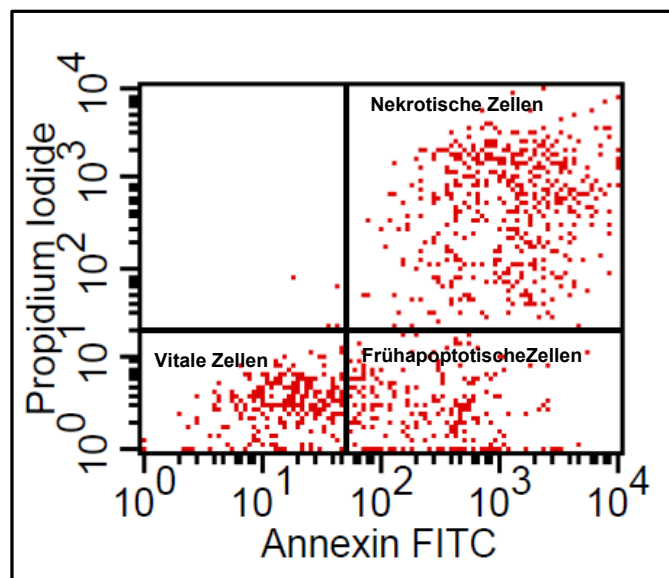


Abbildung 6 Detektion früh- und spätapoptotischer Zellen

Dot plot der Durchflusszytometrie zur Detektion der spätapoptotischen/nekrotischen, der frühapoptotischen, und der vitalen Zellen.

2.5 Konfokale Laser-Rastermikroskopie

Um festzustellen, ob die transfizierte siRNA in die Zielzellen eingedrungen ist, wurde die konfokale Laser-Rastermikroskopie verwendet. Bei diesem Verfahren werden in verschiedenen Ebenen optische Schnitte durch die zu untersuchenden Zellen gelegt und das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht einer Ebene durch eine Lochblende fokussiert, welches in mehreren Einzelbildern abgebildet und anschließend zusammengesetzt wird. Der Vorteil gegenüber der konventionellen Lichtmikroskopie besteht darin, dass Licht aus anderen Fokusebenen, welches eine gewisse Unschärfe produziert, ausgeblendet wird und dadurch ein sehr scharfes und gut definiertes Bild entsteht. Ein Laserstrahl mit bekannter Wellenlänge rastert das zu untersuchende Objekt punktwise ab. Die dabei entstehenden Emissionen werden nach Durchtreten des Strahlenleiters aufgetrennt, wobei die einstellbare Lochblende und ein Emissionsfilter das Licht auf einzelne Detektoren aufteilt. Das dadurch selektierte Spektrum von Interesse kann dann herausgefiltert werden und wird an einem Sensor in elektrische Signale umgewandelt, die dann durch einen Computer zu einem Bild zusammengesetzt werden.

Das hier genutzte Laser-Rastermikroskop LSM 410 von der Firma Zeiss verfügt über einen externen Argon-Laser (mit den Wellenlängen 458 nm, 488 nm und 510 nm) und zwei interne Helium-Neon-Laser (mit den Wellenlängen 543 nm und 633 nm). Dazu besitzt es einen Durchlichtdetektor und zwei Auflichtfluoreszenzdetektoren (PMT) mit vorgelagertem Band-Pass-Emissionsfilter (BP) und Lang-Pass-Emissionsfilter (LP) und der dazugehörigen Lochblende. Als Messungs- und Auswertungssoftware diente die LSM Software v3.98.

Tabelle 5 Fluoreszenzfarbstoffe der LSM

Fluoreszenzfarbstoff	Laser	Emissionsfilter	Auflichtfluoreszenzdetektoren
Alexa Fluor 488	Argon-Laser	BP 510-525	PMT2
PKH26GL	Helium-Neon-Laser	LP 570	PMT1

Zur Darstellung der Zellmembran wurde der Farbstoff PKH26GL der Firma Sigma Aldrich verwendet.

2.5.1 Färbung mit PKH26GL

Der rot fluoreszierende Farbstoff PKH26GL bindet an die Lipidregion von Zellmembranen. Die Zellen wurden vor der Färbung zwei Mal mit Medium ohne Zusätze bei 180 x g für 10 Minuten bei 10 °C gewaschen. Nach Verdünnung mit der Lösung C im Verhältnis 1:125 wurde die Farbstofflösung mit dem Zellpellet im gleichen Volumen der Lösung C aufgenommen und bei Raumtemperatur für 2 bis 5 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde nach Zugabe des gleichen Volumens an FKS gestoppt. Danach wurde die Zellsuspension mit dem gleichen Volumen an Komplettmedium bei 180 x g für 10 Minuten bei 25 °C gewaschen. Überschüssiger Farbstoff wurde mittels drei weiterer Waschschriffe mit PBS entfernt. Die gefärbten Zellen wurden nach Aufnahme in Komplettmedium in einen Objektträger mit Zählkammern pipettiert. Die zur LSM genutzten Fluoreszenzfarbstoffe und deren Eigenschaften zeigt Tabelle 5.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 RNA-Isolierung

In dieser Arbeit wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen (Kat.Nr. 74104) genutzt. Die Prozedur erfolgt streng nach Angaben des Herstellers (Handbuch: 3.Edition, 2001).

Zur Freisetzung der RNA wurden die Zellen mit 350 µl RLT-Mercaptoethanol-Puffer lysiert. Nach Filtration wurde die Mischlösung zu gleichen Anteilen mit Ethanol versetzt und auf die Silica Membransäule gegeben, an welche die RNA und andere Zellbestandteile gebunden wurden. Nach mehreren Waschschriffen und Elimination genomischer DNA durch DNase I konnte eine reine RNA-Lösung hergestellt werden. Zur Lösung von der Silica Membran wurde die RNA in 20 bis 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

2.6.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde 1 µl der RNA-haltigen Lösung auf die Analyseoberfläche des Spektralphotometers Nanodrop ND 1000 pipettiert und bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Reinheit der RNA wurde aus dem Quotienten von A260/A280 bestimmt. Das ideale Verhältnis für proteinfreie Nukleinsäuren liegt bei 1,8 bis 2,0.

2.6.3 Reverse Transkription

Zur Herstellung der für die Polymerasekettenreaktion nötige cDNA wurde das SuperScript II Reverse Transcriptase-Kit von Invitrogen genutzt. In der hier genutzten reversen Transkriptase ist eine DNA-Polymeraseaktivität und eine RNase H-Aktivität vorhanden (Kotewicz et al., 1988). Nachdem die RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben wurde, wird die daraus entstandene RNA-DNA-Hybridhelix durch die RNase H-Aktivität von der enthaltenen RNA befreit. Weiterhin wird der cDNA-Strang in eine doppelsträngige cDNA synthetisiert.

Es wurden 1 µg RNA, 3 µg Oligo dT Primer und nukleasefreies Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 µl auf Eis zusammen pipettiert. Danach erfolgte eine Denaturierung auf dem Thermoblock bei 70 °C für 10 Minuten. Um die Synthese zu initiieren wurden 5 x Puffer, 0,2 mM DTT, 0,2 mM dNTP und 200 units Superscript II reverse Transkriptase dazugegeben und anschließend für 60 Minuten bei 42 °C auf dem Heizblock inkubiert. Zum Beenden des Prozesses wurden die Proben für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt. Bis zur Benutzung wurde die cDNA dann bei - 20 °C aufbewahrt.

2.6.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerasekettenreaktion ist es möglich, einen definierten Sequenzbereich der DNA zu amplifizieren. Erstmals erwähnt wurde dieser natürlich vorkommende Prozess als DNA-Reparaturmechanismus 1971 von Kleppe (Kleppe et al., 1971). Vollständig aufgedeckt und nutzbar gemacht wurde der Prozess später durch Mullis (Mullis et al., 1986). Eine Optimierung des Prozesses konnte dann durch die synthetische Herstellung der thermostabilen DNA-Polymerase erreicht werden, die im Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) entdeckt wurde (Saiki et al., 1988). An den beiden entgegengesetzten Enden der DNA-Doppelhelix bindet jeweils ein komplementäres Oligonukleotid-Startermolekül (Primer).

Die dort ansetzende Taq-Polymerase vervielfältigt dann bei genügend vorliegenden Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dTNP) die Zielsequenz. Außerdem benötigt die DNA-Polymerase einen entsprechenden Puffer, der als Cofaktor zweiwertige Magnesiumionen enthalten muss.

Der gesamte Prozess kann in drei Schritte unterteilt werden: In der Initialphase wird die DNA zu zwei Einzelsträngen denaturiert, damit sich in der zweiten Phase des

Annealing die Primer an die Einzelstränge anlagern können. In der dritten und letzten Phase wird nun durch die Taq-Polymerase der komplementäre DNA-Doppelstrang synthetisiert.

Als Referenzgen wurde β 2-Mikroglobulin genutzt. Die genutzten Primer und deren Sequenzen sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6 Primer und Sequenzen der PCR

Primer	Position	Sequenz
β 2-Mikroglobulin	sense	5'-CCT CCA TGA TGC TGC TTA CAT GTC-3'
β 2-Mikroglobulin	Antisense	5'-ATG TCT CGC TCC TGG CCT TGA CT-3'
Vigilin	sense	5'-ACC GTT TTG CTG TGG TTT TC-3'
Vigilin	antisense	5'-GAG GGT CGC TCT CCT CTT CT-3'

Eine Wasserprobe durchlief den Zyklus als Negativkontrolle mit.

Der gesamte Ansatz der Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

Komponenten	Menge in μ l
10 x Puffer	5
100 mM dNTP	5
25 pmol/ μ l sense Primer	0,5
25 pmol/ μ l antisense Primer	0,5
5000 U/ml Taq-Polymerase	0,2
cDNA	2-4
Wasser	ad 50

Der gesamte Prozess wurde in dem Cyclyer der Firma Biozym durchgeführt. Die Einstellungen der einzelnen Reaktionsschritte der PCR für Vigilin und β 2-Mikroglobulin folgen in Tabelle 7.

Tabelle 7 PCR-Bedingungen des Vigilins und β 2-Mikroglobulins

Zyklen	Zeit	Temperatur
1	5 Minuten	95°C
35	40 Sekunden	94°C
	40 Sekunden	60°C
	50 Sekunden	72°C
1	5 Minuten	72°C
	∞	4°C

2.6.5 Agarosegelelektrophorese

Zum Nachweis der PCR-Produkte wurde die Agarosegelelektrophorese genutzt. Bei dieser Methode werden die Nukleinsäuren nach ihrer Größe aufgetrennt. Kleinere Fragmente wandern schneller im elektrischen Feld als größere. In der vorliegenden Arbeit wurde ein 2,5%iges Gel hergestellt. Dazu wurde die Agarose in 0,5 x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach dem Abkühlen auf 50 °C mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid gemischt. Anschließend wurde die Agaroselösung vorsichtig in eine Gelkammer gegossen und ein Kamm als Taschenformer eingesetzt. Ethidiumbromid ist ein interkalierender und karzinogener Farbstoff der an DNA-Moleküle bindet und diese unter UV-Licht sichtbar macht.

Nach Aushärten des Gels wurde es in eine mit 0,5 x TBE Puffer gefüllte horizontale Gelkammer eingesetzt, der Kamm entfernt und jede Geltasche mit 10 µl PCR-Produkt und 5 µl Probenpuffer befüllt. Als Größenstandard wurde die 100 bp Leiter von Amersham Biosciences genutzt. Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei einer konstanten Spannung von 10 V/cm.

2.6.6 Herstellung von Proteinextrakten

Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend das Pellet in 50 bis 100 µl Lysepuffer über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Bei Bedarf erfolgte eine physikalische Zerstörung der Zellen durch Ultraschallimpulse. Zum Abschluss erfolgte mehrmaliges Vortexen in einer Zeitspanne von 30 Minuten. Eine anschließende Zentrifugation bei 10286 x g bei 4 °C für 2 Minuten trennte die zellulären Bestandteile vom Proteinüberstand, welcher in ein 1,5 ml Probengefäß pipettiert wurde, um der Proteingehaltsbestimmung nach Bradford zugeführt zu werden.

2.6.7 Proteinbestimmung nach Bradford

Durch Bindung des Farbstoffes Coomassie-Blau G-250 an Proteine erfolgt ein Farbumschlag von rotbraun nach blau. Die dadurch entstehende Änderung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm kann im ELISA-Reader gemessen werden und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Zur Berechnung wurde eine Proteineichkurve mit bekannten Konzentrationen aus einer BSA-Stammlösung hergestellt (siehe Tabelle 8). Die Absorptionsmessung erfolgte im linearen Bereich der Eichkurve, um eine proportionale Zunahme der Extinktion zur Lichtabsorption zu erreichen und so ein möglichst genaues Ergebnis der Proteinkonzentration zu erhalten. Die hergestellten Proteinstandards wurden zu je 800 µl Aliquots bei -20 °C eingefroren.

Tabelle 8 Herstellung der Standardreihe für den Bradford-Test

BSA Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	BSA Stammlösung (c = 1,41 mg/ml) in μl	Aqua dest. in μl
0	-	4230
1	3	4227
2	6	4224
4	12	4218
6	18	4212
9	27	4203
12	36	4194
16	48	4182
20	60	4170
25	75	4155

Von jeder Probe wurden mehrere Verdünnungen mit Aqua dest. in einem Volumen von 800 μl angesetzt, mit 200 μl Bradfordreagenz gemischt und für 5 Minuten inkubiert. Aus jedem Ansatz wurden 3 Proben zu je 200 μl in eine 96-Wellplatte pipettiert. Anschließend wurde die Extinktion mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Die erhaltenen Werte der Triplets wurden gemittelt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung und der Probenmenge konnte mit Hilfe des Proteinstandards die Proteinkonzentration bestimmt werden.

Im Anschluss erfolgte die Denaturierung der Probe in Probenpuffer und 5% β -Mercaptoethanol für 10 Minuten bei 95 °C. Das Lysat wurde bis zur weiteren Nutzung bei -80 °C eingefroren.

2.6.8 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine nach gelelektrophoretischer Aufspaltung auf ein Trägermedium übertragen, um anschließend durch spezifische Antikörperbindung und Färbung nachgewiesen zu werden (Renart et al., 1979). Hier wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Towbin et al., 1979). Der Nachweis erfolgte mittels alkalischer Phosphatase und Chemielumineszenz.

2.6.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die in den Lysaten enthaltenen Proteine wurden nach ihrem Molekulargewicht in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Bündelung in einem Sammelgel wandern die Proben gleichmäßig durch ein Trenngel.

Das gegossene Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, um eine ebene und gleichmäßige Trennkante zu erhalten. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel darüber gegossen und ein Kamm eingefügt, um die Probenaschen zu formen. Nach Polymerisation wurde der untere Spacer entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt, welche mit 1 x Elektrophoresepuffer befüllt wurde. Die Proben wurden dann in die Taschen eingefüllt. Große Volumenungleichheiten wurden mit 1 x Probenpuffer ausgeglichen. Als Proteinstandard diente der zweifarbige Precision Plus Protein Standard Dual Color der Firma Bio-Rad. Zur Durchwanderung des Sammelgels wurde eine Spannung von max. 200 V bei 20 bis 25 mA angelegt. Sobald die Proben das Trenngel erreichten, wurde die Stromstärke auf 30 bis 35 mA erhöht bzw. auf 6 mA gesenkt, wenn die Prozedur über Nacht lief.

2.6.8.2 Semi-Dry-Western-Blot

Um die aufgetrennten Proteine zu detektieren, wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran durch das Semi-Dry-Blot-Verfahren übertragen.

Neun Chromatografiepapiere sowie die Nitrozellulosemembran wurden auf die passende Größe des SDS-Polyacrylamidgels zurechtgeschnitten und in Anode-I-, Anode-II- bzw. Kathodenpuffer äquilibriert. Der Aufbau des Blots ist in Abbildung 7 dargestellt. Luftblasen wurden entfernt und die anschließende Proteinübertragung bei 2 mA/cm² und max. 10 Watt für eine Stunde durchgeführt.

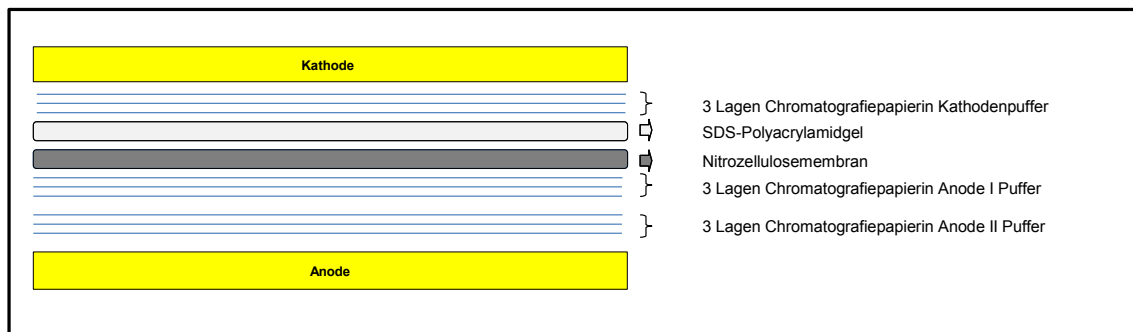


Abbildung 7 Schematischer Aufbau eines semi-dry Western Blot

2.6.8.3 Proteinfärbung über Ponceau S

Zum Nachweis des erfolgreichen Transfers der Proteine wurde eine Ponceau S Färbung durchgeführt. Die Membran wurde für 2 bis 5 Minuten in Ponceau S inkubiert und dann mit Aqua dest. gespült, um den Hintergrund zu entfärben. Zur Entfärbung der Membran wurde diese drei Mal in Anode-II-Puffer gewaschen.

2.6.8.4 Blockierung und Immunreaktion

Um unspezifische Proteinbindungen aus der Immunreaktion auszuschließen, wurde die Membran für 2 Stunden in 15%iger Magermilch geblockt. Danach erfolgte eine dreimalige Waschung der Membran für je 10 Minuten in TBST-Puffer. Der verdünnte Primär-Antikörper (bezogen von Charli Kruse, Universität Lübeck) wurde dann in 0,1% BSA-TBST-Lösung im Kühlschrank unter stetigem Schwenken auf einem Schüttler über Nacht inkubiert. In Tabelle 9 sind die genutzten Primärantikörper dargestellt.

Tabelle 9 Primär-Antikörper

Antikörper	Hersteller	Quelle	Verdünnung
Anti-Vigilin	Charli Kruse/Universität Lübeck	Kaninchen	1:500
Anti-Vigilin (T15)	Santa Cruz Biotechnology	Ziege	1:500
Anti- α -Tubulin	Dako Cytomation, Hamburg	Maus	1:500

2.6.9 Nachweis des Primär-Antikörpers mittels alkalischer Phosphatase

Nach Abschluss der Primär-Antikörper-Inkubation wurde die Membran dreimal in 1 x TBST-Puffer für je 10 Minuten gewaschen. Der Sekundär-Antikörper (siehe Tabelle 10) wurde ebenfalls in 0,1% BSA-TBST-Lösung verdünnt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST-Puffer und einmaligem Waschen in AP-Puffer erfolgte der Nachweis der alkalischen Phosphatase, welche an den Sekundär-Antikörper gebunden ist. Als Substrat für dieses Enzym dient 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT). Die Lösung wurde auf die Membran gegeben und für 3 bis 5 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach Waschung mit Aqua dest. wurde die Membran getrocknet und archiviert.

2.6.10 Nachweis des Primär-Antikörpers mittels Chemielumineszenz

Zum Nachweis des Primärantikörpers wurde ein zweiter Sekundärantikörper eingesetzt an den eine Meerrettichperoxidase gebunden ist (siehe Tabelle 10). Nach Inkubation des sekundären Antikörpers wurde die Membran dreimal in 1 x TBST-Puffer für je 10 Minuten gewaschen. Zur Detektion wurden die Lösungen A und B (ECL Western Blot Detektionsreagenz, GE-Healthcare) in einem Verhältnis von 1:11 gemischt und die Membran darin 5 Minuten inkubiert. Während der Inkubationszeit katalysiert die Meerrettichperoxidase die Oxidierung von Lumigen-PS3. Das dabei emittierte Licht wurde dann mit Hilfe der Kodak-Imager-Station 440 (Programm Kodak 1D.35) detektiert.

Tabelle 10 Sekundär-Antikörper

Antikörper	Detektionenzym	Hersteller	Quelle	Verdünnung
Anti-Kaninchen	Alkalische Phosphatase	Dako Cytomation, Hamburg	Ziege	1:1000
Anti-Kaninchen	Alkalische Phosphatase	Dako Cytomation, Hamburg	Schwein	1:1000
Anti-Maus	Meerrettichperoxidase	Dako Cytomation, Hamburg	Kaninchen	1:5000
Anti-Ziege	Meerrettichperoxidase	ASD Serotec	Kaninchen	1:5000

2.7 WST1- Zellproliferationstest

Mit dem WST1-Test erfolgt eine colorimetrische Bestimmung der Aktivität des Zellmetabolismus durch Umsatz von Tetrazolium-Salzen in einer funktionierenden Atmungskette. Dadurch können direkt Rückschlüsse auf die Menge an viablen Zellen gezogen werden. Das Tetrazolium-Salz WST1 (in Lösung hellrot) wird durch Oberflächenproteine, das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System, zu einem Formazan (in Lösung dunkelrot) reduziert. Dieser Prozess ist NADH-abhängig, welches nur von vitalen Zellen gebildet wird.

In dieser Arbeit wurden jeweils 2×10^4 Zellen in 200 μl Medium mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin in eine 96-Well-Platte als 3fach-Ansatz ausgesät. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden 20 μl der WST1-Lösung zur Zellsuspension pipettiert und bei 37°C und 5% CO₂ für 2 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption am Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) gemessen. Als Blindwert wurde reines Medium mit WST-1 verwendet. Dieser wurde von dem Mittelwert der Absorptionswerte der zu untersuchenden Proben abgezogen.

2.8 Statistik

Bei identischen Versuchen ($n \geq 3$) wurden die Ergebnisse als Mittelwert mit den jeweiligen Standardabweichungen angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Excel Version 2013 für Windows. Der Vergleich erfolgte mittels t-Test zwischen den Zellen die mit der spezifischen Vigilin-siRNA behandelt wurden und den Kontrollgruppen (unbehandelte Zellen und Zellen die mit der unspezifischen AlexaFluor-siRNA transfiziert wurden). Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten $<0,05$ angenommen. Die rechnerische Auswertung und grafische Darstellung der Daten erfolgte ebenfalls mit Excel Version 2013.

2.9 Materialien

2.9.1 Geräte und Materialien

Geräte

Agarosegelkammer	Biorad
Brutschrank	Heraeus Instruments
Elektro-Blotter, Fastblot 34	Biometra
Elektrophoresekammer	Biorad
FACScan	Becton & Dickinson
Geldokumentationsystem	Herolab
Gene Pulser	Biorad
Heizblock, 2099-DA	Liebisch
ECL-Reader	Kodak
Nanodrop	peQlab
Neubauerzählkammer	Blau Brand
Mikroskop Telaval3	Carl Zeiss Jena
Nikon Eclipse TE 200	Nikon
Konfokales Laser-Rastermikroskop, LSM 410	Carl Zeiss Jena
PCR Cycler	Biorad
Pipettensatz (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf
pH-Meter	Mettler Toledo
sterile Werkbank, Herasafe	Heraeus Instruments
Stromversorgungsgerät, Powerpac 300	Biorad
Stromversorgungsgerät, Powerpac 3000	Biorad
Vortexer	Uni EQUIP
Wasserbad	GFL
Zentrifuge, Beckmann Avanti 30	Beckmann
Zentrifuge, Hettich, Rotina 35 R	Hettich
Zentrifuge, Eppendorf 5418	Eppendorf

Materialien

6-, 24- und 96-Wellplatten	Nunc
2, 5, 10, 25 ml Einweg Pipetten	Greiner bio-one
Chambered Coverglass System	Nunc
Chromatografiepapier, 3 mm CW	Whatman
Einfrierbox	Nalgene
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf
Elektroporationsküvetten	Biorad
FACS-Röhrchen	BD Falcon
Nitrozellulosemembran, Hybon-ECL	Amersham
Pipettenspitzen	Eppendorf
Pipettenspitzen	Greiner bio-one
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym
Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner bio-one
Zellkulturflaschen, 25 cm ² und 75 cm ²	Nunc

2.9.2 Kits und Fertiglösungen

100 bp Leiter, DNA-Längenstandard	Amersham
Annexin V PE Apoptosekit	BD Pharmingen
Biocoll	Biochrom
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche
ECL Plus Western Blotting detection reagents	GE Healthcare
PKH26GL	Sigma
Ponceau S	Serva
Proteinstandard, Dual Color	Biorad
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung	Roth

2.9.3 Nährmedien und Antibiotika

Alpha MEM	Biochrom
DMEM-Medium	Biochrom
IMDM mit L-Glutamin	PAA Laboratories
FKS, hitzeinaktiviert	Gibco
Penicillin Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco
RPMI-Medium-1640	Biochrom

2.9.4 Enzyme

Taq-Polymerase	Pharmacia Biotech
Superscript II	Invitrogen
DNase	Qiagen

2.9.5 Chemikalien

6 Aminohexansäure	Roth
2-Propanol	JT Baker
Agarose	Biozym
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumpersulfat	Sigma
BCIP	Sigma
Bromphenolblau	Roth
BSA	Serva
Borsäure	Roth
β -Mercaptoethanol	Merck
DMSO	Sigma
dNTP	Pharmacia Biotech
EDTA	Merck
Ethanol	Zentralapotheke Uni Rostock
Ethidiumbromid	Stratagene
Glycin	Merck
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth

Methanol	Labscan Analytical Sciences
Milchpulver	Roth
Natriumchlorid	Merck
NBT	Sigma
N, N, Dimethylformamid	Merck
Pefablock SC-Protease Inhibitor	Roth
Propidiumiodid	Sigma
Salzsäure	Zentralapotheke Uni Rostock
SDS	Serva
TEMED	Sigma
Tris Base	Roth
Triton X-100	Sigma
Trypanblau	Sigma

2.9.6 Puffer und Lösungen

1x TBST (pH 8,0)	Natriumchlorid	8,76	g
	Tris Base	1,21	g
	Triton X-100	0,5	ml
	Aqua dest.	ad 100	ml
AP-Puffer (pH 9,5)	Tris Base	12,1	g
	Natriumchlorid	5,84	g
	Magnesiumchlorid-Hexahydrat	0,2	g
	Aqua dest.	ad 1000	ml
Anode I Puffer	Tris Base	3,63	g
	Methanol	200	ml
	Aqua dest.	ad 1000	ml
Anode II Puffer	Tris Base	36,3	g
	Methanol	200	ml
	Aqua dest.	ad 1000	ml

Kathodenpuffer	Tris Base	3,028	g
	6-Aminohexansäure	5,25	g
	Methanol	200	ml
	Aqua dest.	ad 1000	ml
BCIP-Lösung	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- phosphat-p-Toluidin-Salz	7,5	mg
	N,N-Dimethylformamid	500	µl
NBT-Lösung	Nitrotetrazoliumblausäurechlorid	5	mg
	N,N-Dimethylformamid	400	µl
	AP-Puffer	100	µl
BCIP/NBT-Gebrauchslösung	BCIP-Lösung	500	µl
	NBT-Lösung	500	µl
	AP-Puffer	ad 50	ml
Pefabloc 100 mM	Pefabloc	100	mg
	Aqua dest.	ad 4,20	ml
Lysepuffer	PBS	750	µl
	NP 40	250	µl
	Pefabloc (100 mM)	20	µl
2 x Probenpuffer	SDS	3,8	g
	Glycerin	22	ml
	EDTA (5 mM, pH 8)	2	ml
	Sammelgelpuffer	25	ml
	Bromphenolblau	1	
	Aqua dest.	Spatelspitze ad 100	ml
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	Tris Base	6,06	g
	SDS	0,4	g
	Aqua dest.	ad 100	ml

Trenngelpuffer (pH 8,8)	Tris Base	36,33	g
	SDS	0,8	g
	Aqua dest.	ad 200	ml
3 x Elektrophoresepuffer	Tris Base	81,81	g
	Glycin	380,7	g
	SDS	27	g
	Aqua dest.	ad 9000	ml
0,5 x TBE	Tris Base	27	g
	Borsäure	13,75	g
	EDTA (0,5 M, pH 8)	10	ml
	Aqua dest.	ad 5000	ml
SDS-Polyacrylamid-	Aqua dest.	17,8	ml
Trenngel 8%	Trenngelpuffer	8,25	ml
	Acrylamidstocklösung 40%	6,7	ml
	10% APS	0,2	ml
	TEMED	20	µl
	Aqua dest.	5,1	ml
SDS-Polyacrylamid- Sammelgel	Sammelgelpuffer	2,1	ml
	Acrylamidstocklösung 40%	1	ml
	10% APS	30	µl
	TEMED	10	µl

3 Ergebnisse

3.1 Vigilin-Expression in Zellen der AML

Zu Beginn wurde der Nachweis der Vigilin-Expression auf mRNA-Ebene durchgeführt. Dazu wurden immer mindestens 1×10^6 Zellen lysiert um 1 µg RNA zur reversen Transkription einsetzen zu können. Die aus der dann folgenden PCR entstandenen Produkte wurden auf Agarosegelen aufgetrennt. Der positive Nachweis gelang in Zellen der AML-Zelllinien HL60 und NB4 und in *de novo* Blasten von erkrankten Patienten. Von 14 untersuchten Patienten konnte in 11 Proben die mRNA und in 5 das Vigilin-Protein nachgewiesen wurde (Tabelle 11). Abbildung 8 zeigt eine exemplarische Darstellung der PCR-Ergebnisse für die Zelllinien HL60, NB4 und 10 Patienten. Als Kontrolle nutzten wir gegenüber dem 161 bp schweren Vigilin-PCR-Produkt das 350 bp β 2-Mikroglobulin als Referenzgen.

Tabelle 11 mRNA und Protein-Nachweis in *de novo*-AML Blasten

Patient	mRNA	Protein
P1	Positiv	Negativ
P2	Positiv	Positiv
P3	Positiv	n.b.
P4	Positiv	n.b.
P5	Positiv	Negativ
P6	Positiv	Negativ
P7	Positiv	n.b.
P8	Positiv	Negativ
P9	Positiv	Positiv
P10	Positiv	Positiv
P11	Positiv	n.b.
P12	n.b.	Positiv
P13	n.b.	Positiv
P14	n.b.	Negativ

(n.b. = nicht bestimmt)

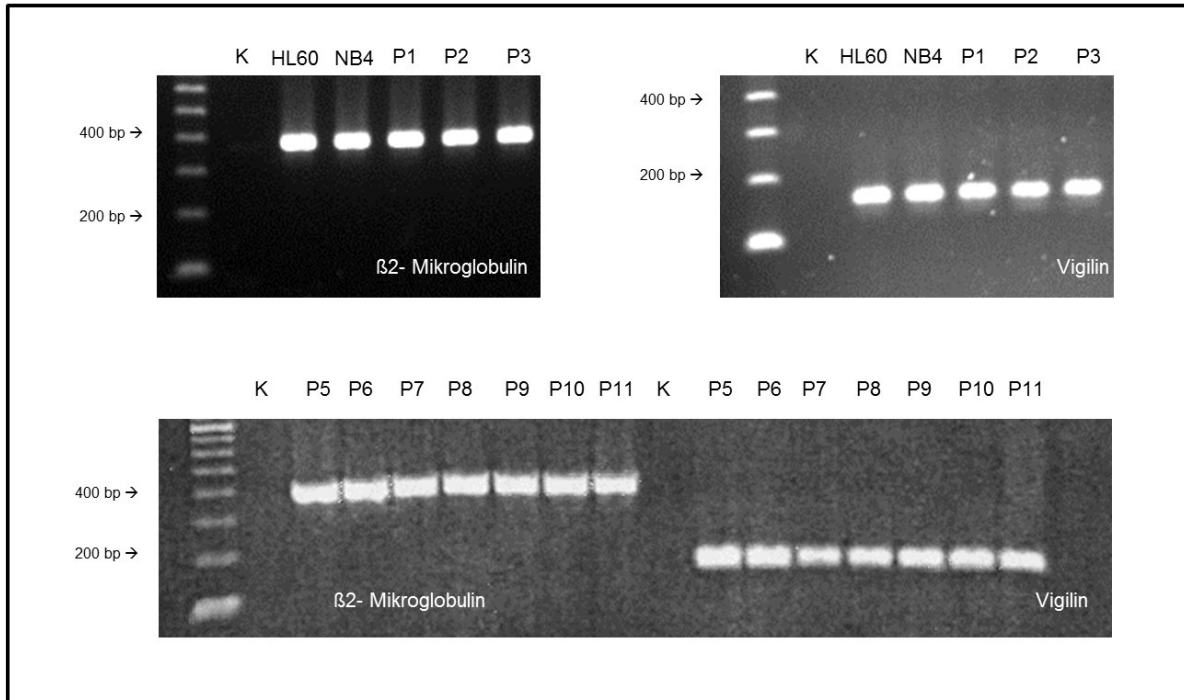


Abbildung 8 Vigilin-mRNA-Expression

Vigilin-mRNA-Expression in den Zelllinien HL60 und NB4 und *de novo* AML-Zellen (P1 bis P3 und P5 bis P11).
K: Kontrolle; P: Patienten

Der Nachweis von Vigilin auf Proteinebene erfolgte mittels Western Blot. Hierfür wurden von den Zelllinien 80 μ g Protein und von den Patientenproben bis zu 240 μ g Protein aufgetragen. Da nicht von allen Patienten ausreichend Material zur Verfügung stand, konnten nicht alle Proteinlysate für den Western Blot genutzt bzw. miteinander verglichen werden.

In beiden AML-Zelllinien sowie in den Patientenproben konnte ein positiver Vigilinnachweis erbracht werden. Ein exemplarisches Western Blot-Ergebnis ist in Abbildung 9 dargestellt.

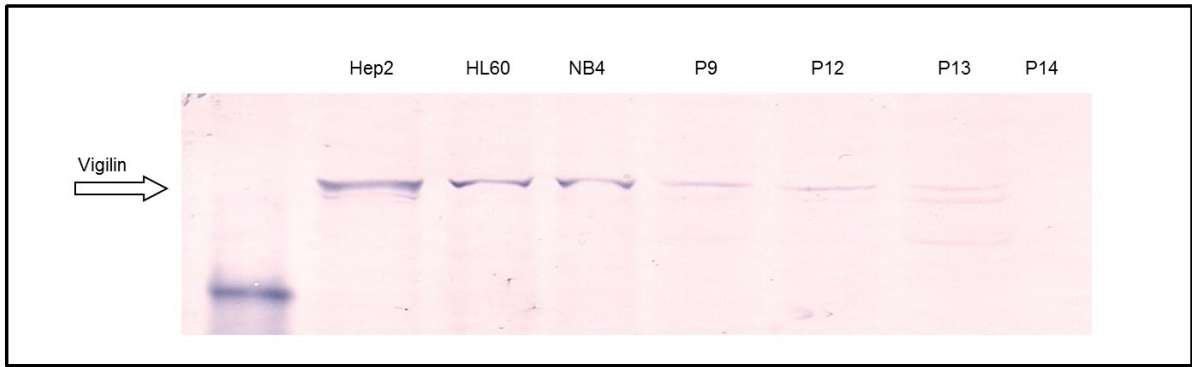


Abbildung 9 Vigilinprotein-Expression

Vigilinprotein-Expression in den AML-Zelllinien HL60, NB4 und 4 *de novo* AML-Zellen (P). Nachweis des gebundenen Primärantikörpers durch eine an den Sekundär-Antikörper gebundene alkalische Phosphatase.

3.2 Transfektionsergebnisse

Zur Transfektion wurde die Methode der Elektroporation genutzt. Diese wurde in vier voneinander unabhängigen Versuchen durchgeführt. Zum Ausschluss unspezifischer Hemmeffekte wurde eine mit Alexa Fluor markierte unspezifische siRNA genutzt. Es wurden 1×10^7 Zellen der Zelllinien HL60 und NB4 elektroporiert. Die Transfektionseffizienz wurde mittels konfokaler Laserrastermikroskopie und Durchflusszytometrie bestimmt. Anschließend erfolgte die Kultivierung über 96 Stunden. Untersuchungen zum Einfluss von Vigilin auf die Zellproliferation wurden mithilfe des WST-1 Tests durchgeführt. Außerdem wurde der Anteil früh- und spätapoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmt. Die abschließende Prüfung zur Effizienz der Vigilinhemmung erfolgte mittels Western Blot.

3.2.1 Ergebnisse der Transfektionseffizienz

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz dienten die Durchflusszytometrie und die konfokale Laser-Rastermikroskopie (LSM). Im Gegensatz zur Durchflusszytometrie, welche nur das reine Fluoreszenzsignal messen kann, gelingt bei der LSM durch die Darstellung der Zelle in differenten Schichten eine genaue Lokalisation der siRNA. Dies ist von Bedeutung, da nur die intrazellulär lokalisierte siRNA den gewünschten Effekt der RNA-Interferenz bewirken kann.

3.2.1.1 Konfokale Laserrastermikroskopie

Sechs Stunden nach Elektroporation der Zellen wurde die Transfektionseffizienz am konfokalen Laserrastermikroskop bestimmt. Es wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt und die Anzahl der intakten Zellen mit grüner Fluoreszenz bestimmt. Das rote Signal der Farbstoffes PKG26GL diente zur genauen Detektion von Zellen mit intakter Zellmembran. Da eine Zellzählung nur einen ungefähren Wert angeben kann, diente diese Methode zu einer ersten Abschätzung der Transfektionseffizienz und korrekten intrazellulären Lokalisierung der siRNA (siehe Abbildung 10). In beiden Zelllinien lag der Anteil der korrekt transfizierten Zellen mit intrazellulär lokalisierter siRNA bei über 90%.

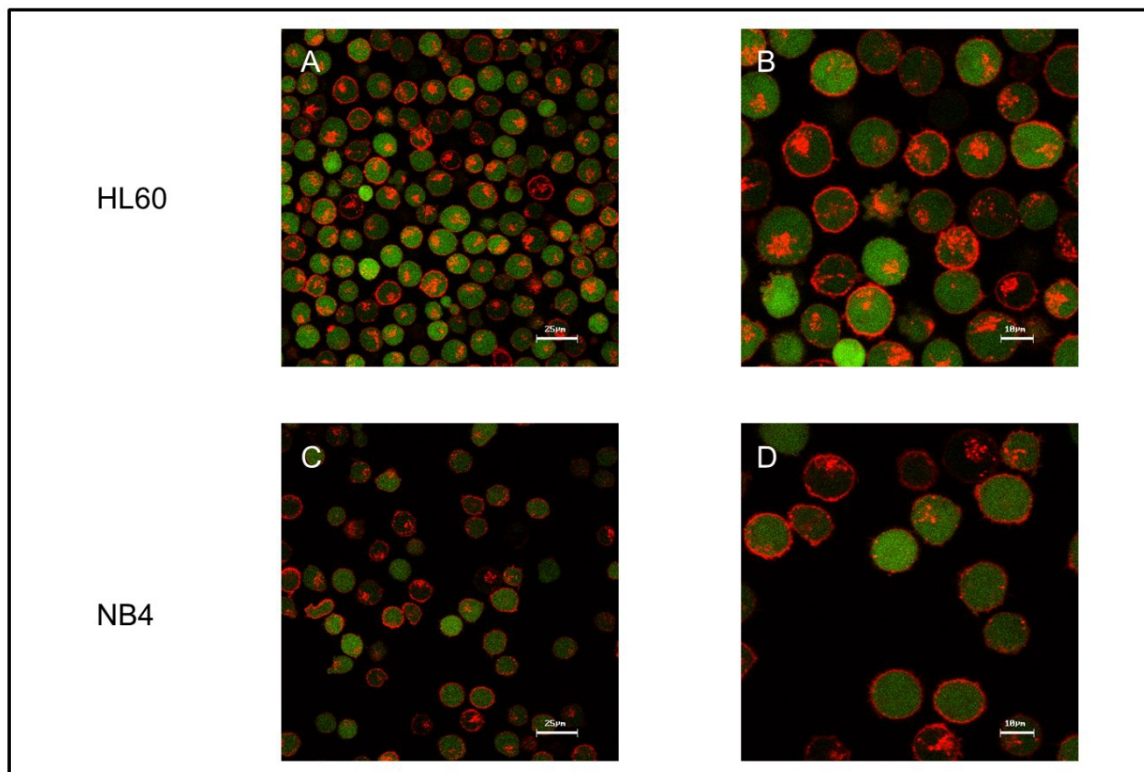


Abbildung 10 Ermittlung der Transfektionseffizienz mittels LSM

In der oberen Reihe (A und B) sind die LSM-Aufnahmen nach Transfektion der Zelllinie HL60 und in der unteren Reihe (C und D) die der Zelllinie NB4 dargestellt. Das jeweils rechte Bild ist eine vergrößerte Darstellung. Der intrazelluläre Raum stellt sich aufgrund des Eindringens der AlexaFluor488-siRNA grün dar und erlaubt nach Auszählen einer repräsentativen Anzahl an Zellen, eine Abschätzung der Transfektionseffizienz. Hier zeigte sich eine Transfektionseffizienz von über 90% in beiden Zelllinien.

3.2.1.2 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrisch konnten die in der LSM gesehenen Ergebnisse bestätigt werden (siehe Abbildung 11). Für die Messung wurden jeweils 2×10^5 Zellen verwendet. Es zeigte sich eine Transfektionsrate bei HL60 mit 97,5% und NB4 mit 97,2%.

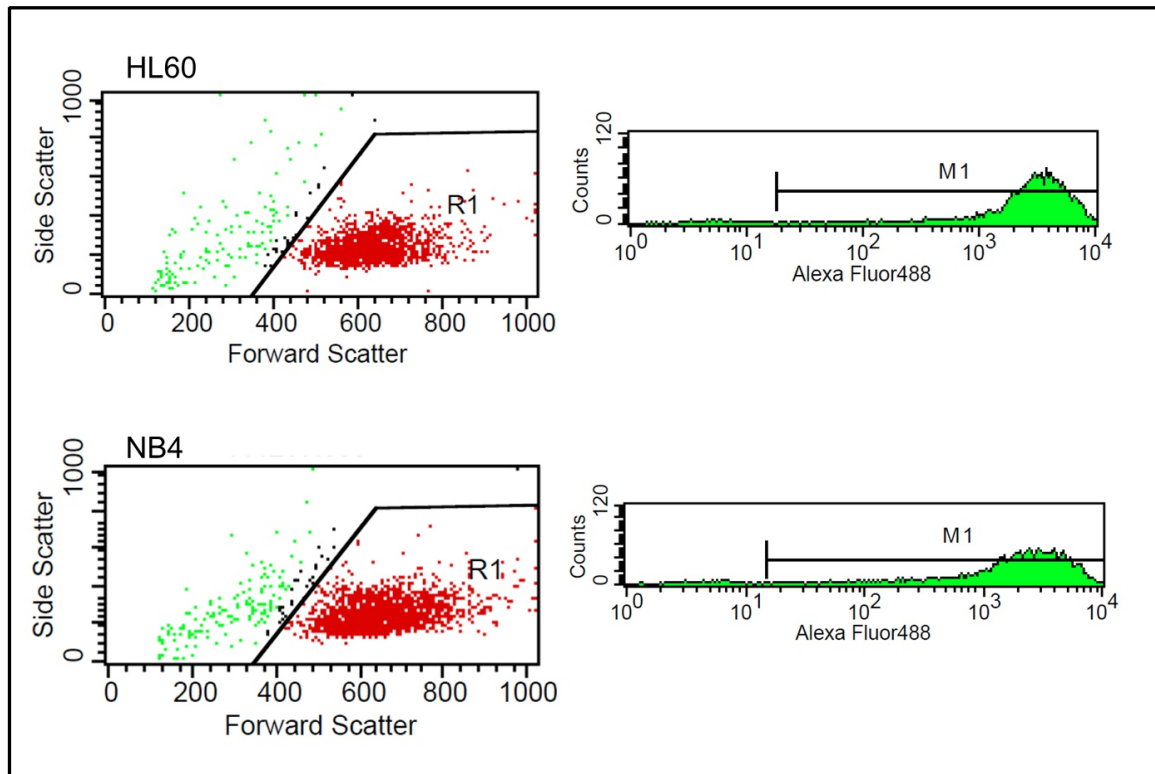


Abbildung 11 Bestimmung der Transfektionseffizienz bei HL60 und NB4

Wie unter 2.4.1. erläutert wurde die Transfektionseffizienz an den beiden Zelllinien HL60 und NB4 am Durchflusszytometer bestimmt. In beiden Zelllinien wurde eine Rate von über 97% transfizierter Zellen erreicht.

3.2.2 Ergebnisse des Western Blot

In den Abbildung 12 und Abbildung 13 sind die Western Blots der beiden Zelllinien HL60 und NB4 nach erfolgter Transfektion zu den entsprechenden Messzeitpunkten zu sehen. Es wurden jeweils 60 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die behandelten Zellen der Zelllinie HL60 zeigen keine Änderung der Vigilinexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe und der Expression der Zellen die mit der unspezifischen siRNA behandelt wurden.

In den NB4-Zellen stellt sich bei den mit der Vigilin-siRNA behandelten Zellen, insbesondere zu den Messzeitpunkten 48 bis 96 Stunden, eine schwächere Vigilinbande im Vergleich zur konstanten Bande der Kontrolle und der unspezifischen siRNA dar.

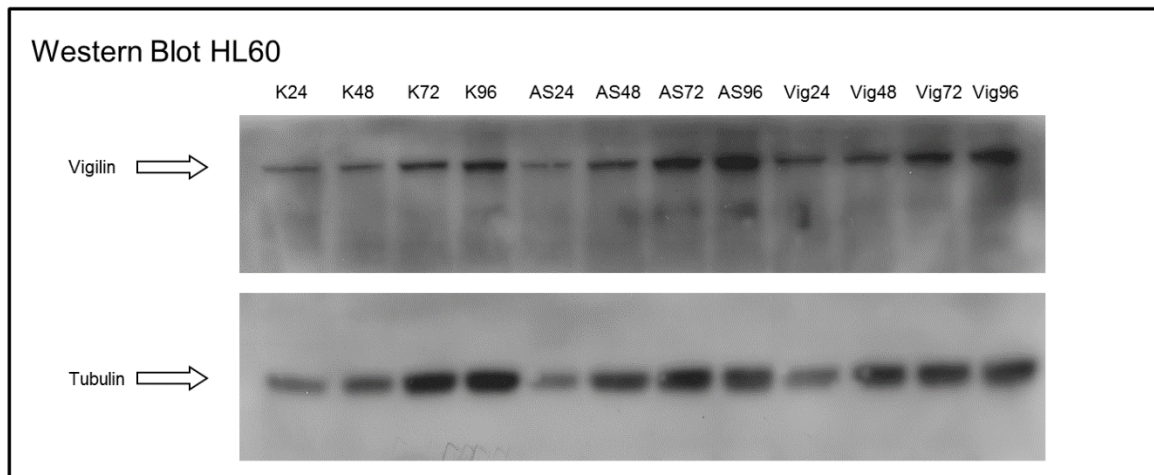


Abbildung 12 Vigilin-Protein-Expression nach Transfektion der Zelllinie HL60

Darstellung der Vigilin-Expression mittels Western Blot nach der siRNA-Transfektion der Zelllinie HL60. Zum Nachweis wurde die Methode der Chemielumineszenz genutzt. **K**: unbehandelte Zellen. **AS**: Zellen die mit der unspezifischen AlexaFluor-siRNA behandelt wurden. **Vig**: Zellen die mit der spezifischen Vigilin-siRNA behandelt wurden. **24, 48, 72, 96**: Messzeitpunkte in Stunden.

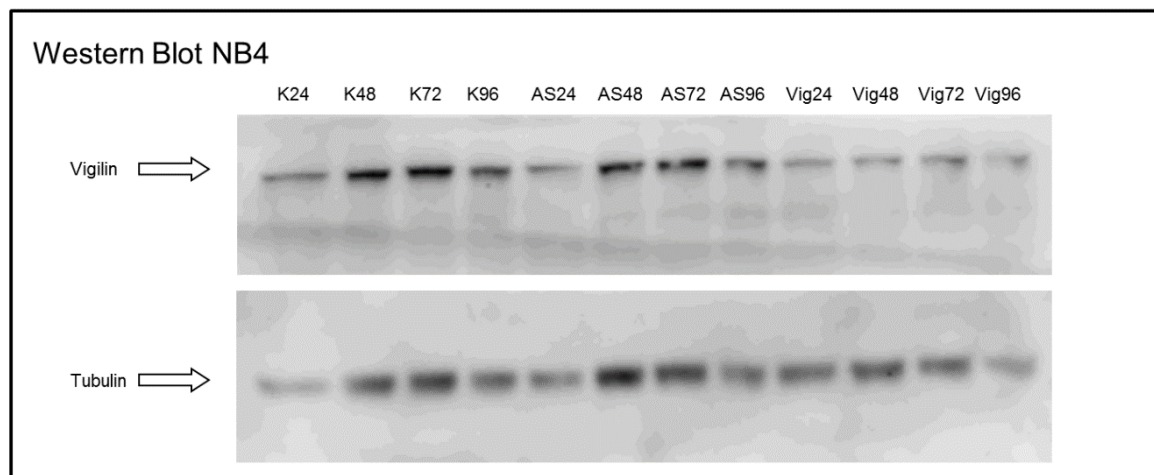


Abbildung 13 Vigilin-Protein-Expression nach Transfektion der Zelllinie NB4

Darstellung der Vigilin-Expression mittels Western Blot nach der siRNA Transfektion der Zelllinie NB4. Zum Nachweis wurde die Methode der Chemielumineszenz genutzt. **K**: unbehandelte Zellen. **AS**: Zellen die mit der unspezifischen AlexaFluor-siRNA behandelt wurden. **Vig**: Zellen die mit der spezifischen Vigilin-siRNA behandelt wurden. **24, 48, 72, 96**: Messzeitpunkte in Stunden.

3.2.3 Ergebnisse der Zellzählung

Die Zellen wurden nach der Inkubation geerntet und in der Neubauerzählkammer gezählt. Bis auf die Kontrolle in der Zelllinie HL60 zeigte sich in allen anderen Gruppen eine stetige Zunahme der Zellzahl (siehe Abbildung 14). Bis auf einen signifikanten Unterschied in der Zelllinie NB4 zwischen den Zellen die mit der spezifischen siRNA und den Zellen, die mit der unspezifischen siRNA behandelt wurden zeigte sich in beiden Zelllinien kein signifikanter Unterschied zwischen den mit der Vigilin-siRNA transfizierten Zellen gegenüber den Zellen der Kontrolle und denen, die mit der unspezifischen siRNA transfiziert wurden.

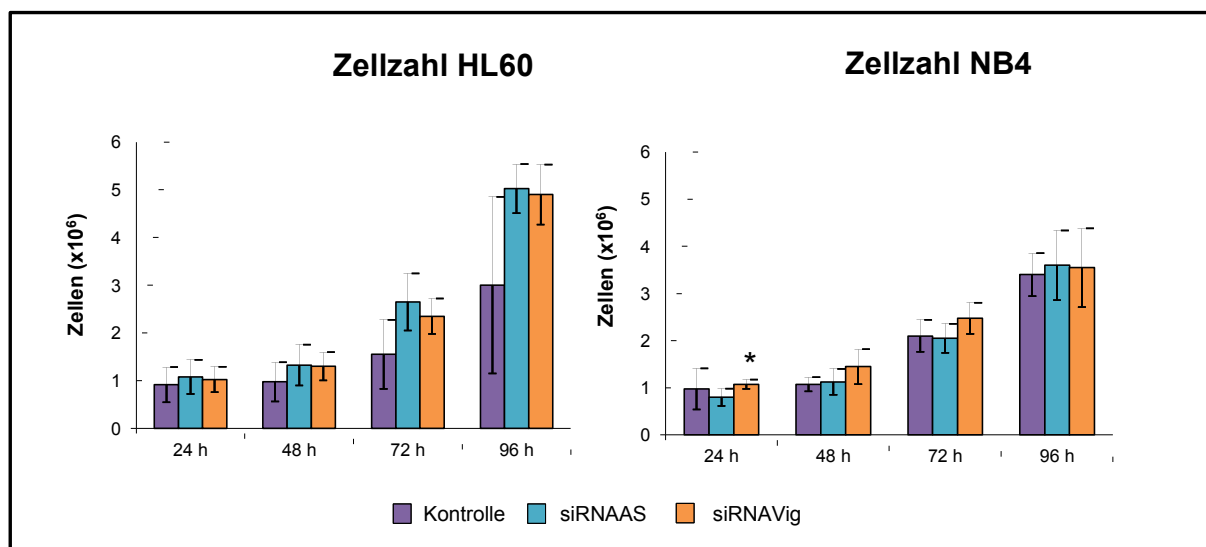


Abbildung 14 Bestimmung der Zellzahl nach Transfektion bei HL60 und NB4

Die Diagramme stellen die Zellzahl der verschiedenen Zellgruppen über 96 Stunden dar. Es zeigt sich, bis auf die Kontrollgruppe der HL60-Zelllinie eine stetige Zunahme der Zellzahl, ohne Hinweis auf eine Proliferationshemmung der mit der Vigilin-siRNA transfizierten Zellen. **K**: unbehandelte Zellen. **AS**: Zellen die mit der unspezifischen AlexaFluor-siRNA behandelt wurden. **Vig**: Zellen die mit der spezifischen Vigilin-siRNA behandelt wurden. **24, 48, 72, 96**: Messzeitpunkte in Stunden. * $p < 0,05$

3.2.4 Ergebnisse des WST1-Test

Der WST1-Test dient zum Nachweis metabolisch aktiver Zellen. In der Zelllinie HL60 zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen die mit der Vigilin-siRNA transfiziert wurden und der Kontrolle. Ansonsten konnte in beiden Zelllinien keine signifikante Änderung der Aktivität der mit der Vigilin-siRNA behandelten Zellen, im Vergleich zur Kontrolle und zu den mit der unspezifischen Alexa-siRNA transfizierten Zellen, gesehen werden. Es bestand somit keine Einschränkung der

Proliferation der mit Vigilin-siRNA behandelten Zellen. In Abbildung 15 ist dies grafisch dargestellt.

Der Wert bei 96 Stunden der HL60-Zellen (im Diagramm nicht dargestellt) ist dadurch zu erklären, dass die Zellen ungehemmt proliferierten und durch den dadurch erhöhten Metabolismus sehr hohe Mengen an Tetrazoliumsalzen umsetzten, und eine stark dunkelrote Zellsuspension entstand, die vom Photometer Werte der Einzelansätze außerhalb des messbaren Bereiches erbrachten, und somit nicht verwertbar waren.

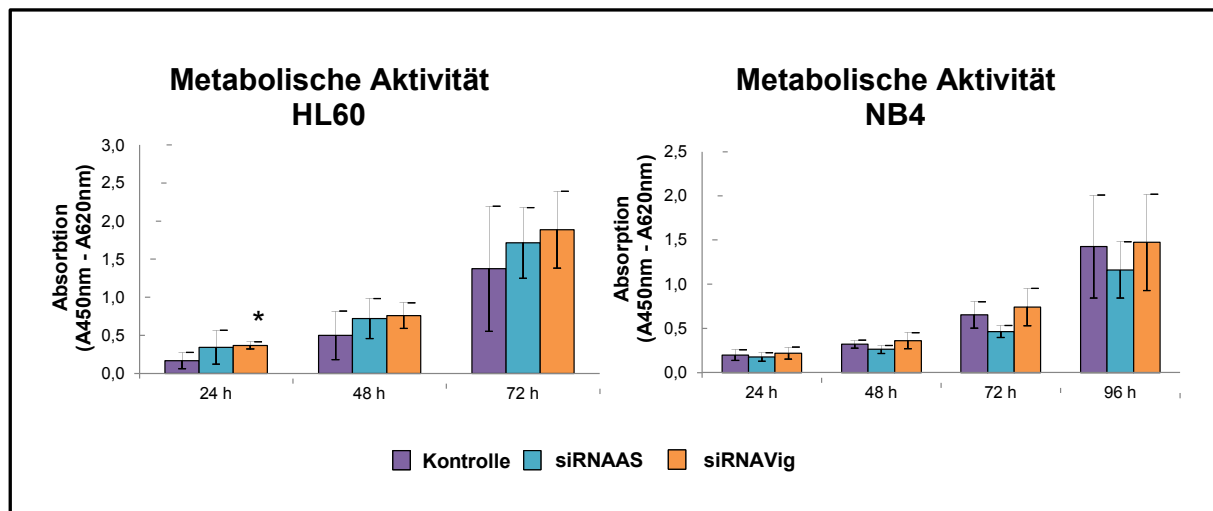


Abbildung 15 Metabolische Aktivität nach Transfektion bei HL60 und NB4

In den Diagrammen ist die Absorption der WST1-Messung als Surrogat-Marker für die metabolische Aktivität der Zellen über die Zeit dargestellt. In allen drei Gruppen konnte kein Unterschied der metabolischen Aktivität und damit keine Einschränkung der Proliferation, gesehen werden. **K**: unbehandelte Zellen. **AS**: Zellen die mit der unspezifischen AlexaFluor-siRNA behandelt wurden. **Vig**: Zellen die mit der spezifischen Vigilin-siRNA behandelt wurden. **24, 48, 72, 96**: Messzeitpunkte in Stunden. * $p < 0,05$

3.2.5 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Mit der Methode der Durchflusszytometrie konnte neben der Transfektionseffizienz die Differenzierung zwischen frühapoptotischen, spätapoptotischen und nekrotischen Zellen erfolgen. Ausgehend davon, dass eine spezifische Hemmung des Vigilins in den Zellen eine frühe Signalkaskade initiiert, würden die Zellen den kontrollierten Zelltod einleiten. Dem gegenüber stehen die nekrotischen Zellen, die vorwiegend durch die Elektroporation stark geschädigt wurden.

Es gab keinen signifikanten Unterschied im Anteil der nekrotischen (Propidiumiodid und Annexin V positiv) und frühapoptotischen (Annexin V positiv und Propidiumiodid negativ) Zellen der Kontrolle im Vergleich zu den Zellen die mit der unspezifischen siRNA und denen die mit der Vigilin siRNA transfiziert wurden.

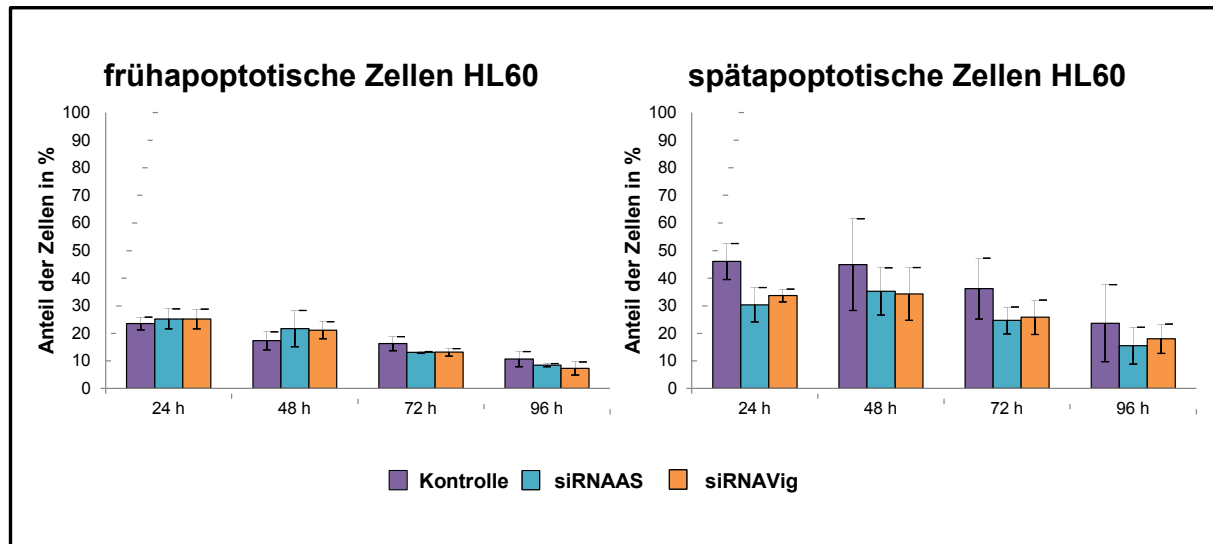


Abbildung 16 Früh- und spätapoptotische Zellen nach Transfektion von HL60

In den beiden Diagrammen ist der Anteil der frühapoptotischen und spätapoptotischen/nekrotischen Zellen der Zelllinie HL60 über die Zeit aus vier unabhängigen Versuchen dargestellt. **K**: unbehandelte Zellen. **AS**: Zellen die mit der unspezifischen AlexaFluor-siRNA behandelt wurden. **Vig**: Zellen die mit der spezifischen Vigilin-siRNA behandelt wurden. **24, 48, 72, 96**: Messzeitpunkte in Stunden.

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmung der früh- und spätapoptotischen Zellen dargestellt. In der behandelten Zelllinie HL60 war der Anteil der frühapoptotischen Zellen in der Gruppe der unspezifischen siRNA im Vergleich zur spezifischen Vigilin-siRNA nach 24 Stunden fast identisch (25,2% vs 25,2 %). Auch im weiteren Verlauf war die Differenz zu keinem Messzeitpunkt größer als 1,2% und somit nicht signifikant. Ebenfalls nicht signifikant ist der Unterschied zwischen den mit der spezifischen Vigilin-siRNA transfizierten Zellen und der Kontrolle. Der Anteil der nekrotischen Zellen allerdings lag in der Kontrollgruppe zu jedem Messzeitpunkt etwas höher (Maximum 24 Stunden mit 44,9%) als in den Zellen die mit der siRNA transfiziert wurden (unspezifische siRNA 24 Stunden 30,4%; Vigilin-siRNA 33,7%). Zwischen den beiden Gruppen der Zellen die transfiziert wurden bestand auch beim Anteil der nekrotischen Zellen kein signifikanter Unterschied.

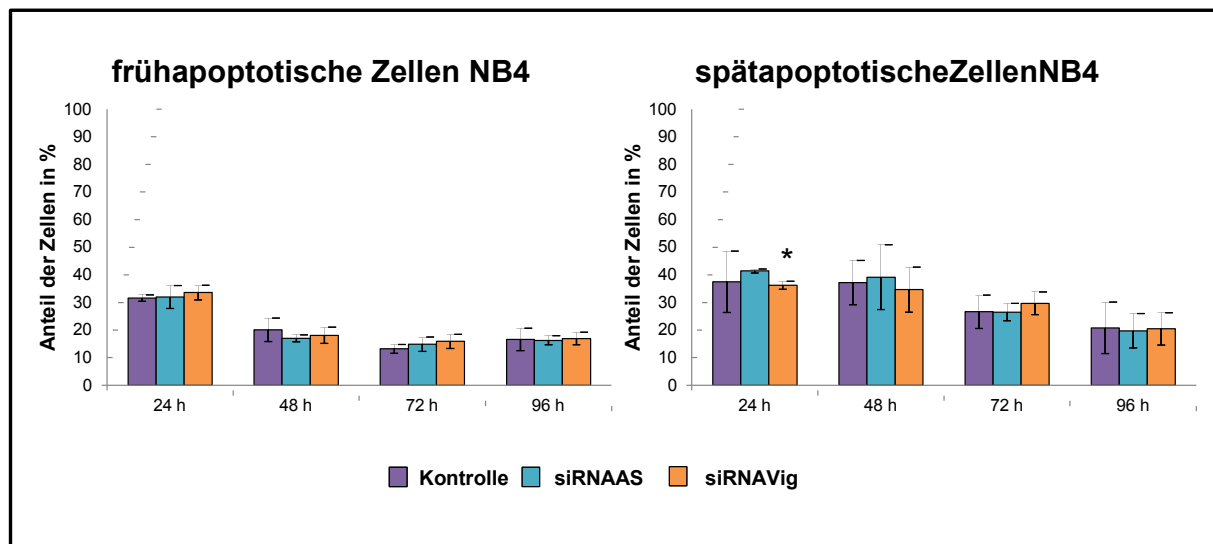


Abbildung 17 Früh- und spätapoptotische Zellen nach Transfektion von NB4

Beide Diagramme zeigen den Anteil der frühapoptotischen und nekrotischen Zellen der Zelllinie NB4 über die Zeit. **K**: unbehandelte Zellen. **AS**: Zellen die mit der unspezifischen AlexaFluor-siRNA behandelt wurden. **Vig**: Zellen die mit der spezifischen Vigiln-siRNA behandelt wurden. **24, 48, 72, 96**: Messzeitpunkte in Stunden.

* p < 0,05

Auch in den behandelten Zellen der Zelllinie NB4 zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Anteil der frühapoptotischen Zellen (siehe Abbildung 17). Das Maximum zeigten die mit der Vigilin-siRNA behandelten Zellen nach 24 Stunden mit 33,5%. Im Vergleich dazu zeigten Zellen, die mit der unspezifischen siRNA behandelt wurden, einen Anteil von frühapoptotischen Zellen von 31,9%. In der Kontrollgruppe lag dieser Anteil nach 24 Stunden bei 31,6%.

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich im Anteil der nekrotischen Zellen der Zellen die mit der spezifischen siRNA behandelt wurden, gegenüber den Zellen die mit unspezifischen siRNA transfiziert wurden. Das Maximum an nekrotischen Zellen, nach 24 Stunden mit einem Anteil von 41,4%, zeigten diejenigen, die mit der AlexFluor-siRNA behandelt wurden.

In beiden Zelllinien zeigten alle drei Gruppen im beobachteten Zeitraum von 96 Stunden eine stetige Verminderung des Anteils der frühapoptotischen und nekrotischen Zellen. Weder durch die spezifische Vigilin-siRNA, noch durch unspezifische Effekte der Transfektion war eine Proliferationshemmung nachweisbar.

4 Diskussion

Die akute myeloische Leukämie des Erwachsenen ist trotz moderner intensiver Therapiestrategien wie Polychemotherapie, allogener Blutstammzelltransplantation und neu entwickelter Medikamente eine bösartige Erkrankung der Hämatopoese mit nur mäßiger Heilungsrate. Abhängig vom Alter des Patienten, seinen zytogenetischen Veränderungen und seines Allgemeinzustandes variiert die Überlebenschance zwischen 10 und 40% (Appelbaum et al., 2006; Juliusson et al., 2009). Neuere Medikamente die auf molekularbiologischer und/oder molekulargenetischer Ebene einen Therapieansatz schaffen (z.B. Deacetylaseinhibitoren), haben sich als wirksam in der Behandlung der AML erwiesen (Abáigar et al., 2013; Estey, 2013).

Das KH-Domänen-Protein Vigilin wurde in der hier vorliegenden Arbeit auf seinen Einfluss auf Proliferation und Apoptose in Zellen der akuten myeloischen Leukämie untersucht, um seine Eignung als mögliches therapeutisches Zielprotein zu ermitteln. Die Bedeutung des Vigilins konnte in der Vergangenheit in Zelllinien solider Tumoren erforscht werden (Duan et al., 2011). Durch seinen Einfluss auf die posttranskriptionelle Genregulation zeigte eine Hemmung dieses Proteins eine deutliche Abnahme der Synthese- oder Proliferationsleistung der Zielzelle (Schuh et al., 2003). Ebenfalls nachgewiesen wurde es in Zellen der akuten lymphatischen Leukämie, allerdings zeigte eine Hemmung des Vigilins mittels siRNA in diesen Zellen keine Änderung der Proliferationsrate der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (Schult, 2008).

In dieser Arbeit sollten nun Daten zur Expression von Vigilin in AML-Zelllinien und AML-*de novo*-Blasten gesammelt werden. Durch Hemmung des Vigilins mittels RNA-Interferenz sollte eine mögliche essentielle Bedeutung für die Genregulation durch Vigilin nachgewiesen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Vigilin in den AML-Zelllinien HL60 und NB4 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene exprimiert wird. In den *de novo*-AML-Blasten des untersuchten Patientenmaterials (n=14) konnte in 11 Proben die mRNA und in 5 Proben das Protein nachgewiesen werden. Bei den anderen Proben war die Menge des verfügbaren Materials begrenzt so dass ein Nachweis des Vigilin-Proteins nicht erbracht werden konnte. Um eine valide Bewertung der Expression von Vigilin in

de novo-Blasten zu erhalten, sollte eine deutlich höhere Anzahl an Patientenprobe untersucht werden.

Die Vigilin-Expression wurde schon mehrfach in gesunden Geweben und Tumorzellen nachgewiesen (Duan et al., 2011; Neu-Yilik et al., 1993). Neu-Yilik et al. konnten Vigilin in Zelllinien der akuten lymphatischen Leukämie nachweisen. Erste Untersuchungen zur Proliferation der lymphatischen Leukämiezellen zeigten keinen wesentlichen Einfluss des Vigilins auf das Wachstumsverhalten (Schult, 2008).

Die Zelllinien HL60 und NB4 zeigten eine deutlich höhere Vigilin-Expression als die Proben der *de novo*-AML der Patienten. Ob diese Unterschiede durch die differente Zytogenetik der immortalisierten Zellen gegenüber den *de novo*-Blasten zustande kommt ist unklar (Dirks and Drexler, 2004). Andere Untersuchungen zeigten veränderte Expressionmuster verschiedener Proteine schon zwischen den Zelllinien (Lee et al., 2002) aber auch zwischen Zelllinien und *de novo*-Material (Leupin et al., 2006).

Eine fehlende Vigilin-Expression zeigt sich in peripheren mononukleären Zellen gesunder Probanden (Schult, 2008). Allerdings zeigen neuere Ergebnisse dass Vigilin auch in gesunden Zellen exprimiert wird und dort maßgeblich an intrazellulären Prozessen beteiligt ist (Lu et al., 2012).

Eine Hemmung des Vigilingens durch Antisense-Oligo-DNA in der Zelllinie HEP2 führte zu einer erhöhten Apoptoserate durch das Fehlen von Vigilin (Schuh et al., 2003). Vorausgegangen sind Untersuchungen die zeigten, dass ein Fehlen des Vigilins die Apoptose auslöst (Goolsby and Shapiro, 2003).

Ob ähnliche Effekte in Zellen der AML induzierbar sind, sollte in dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden. Zur Hemmung des Vigilingens wurde der Prozess der RNA-Interferenz gewählt. Es wurden die nach Goolsby und Shapiro ermittelten spezifischen siRNA-Moleküle Vig1 und Vig 2 zusammen im Verhältnis 1:1 genutzt und mittels Elektroporation in die Zielzelle transfiziert, und sehr hohe Transfektionsraten erzielt (Goolsby and Shapiro, 2003).

In Vorversuchen wurde die zu diesem Zeitpunkt erhältliche effektivste Methode zur Transfektion ermittelt (Schult, 2008). Auch heute stellt die Methode der Elektroporation/Elektropermeabilisation eine effektive Methode zur Transfektion dar (Teissie and Golzio, 2014; Walters et al., 2005; Wei et al., 2008). Das frühere

Problem der sehr niedrigen Transfektionseffizienz und mangelhaften Qualität der siRNA-Transfektion in Suspensionszellen konnte durch Weiterentwicklung und Optimierung der Transfektionsbedingungen größtenteils behoben werden (Ovcharenko et al., 2005). Bei der Methode der Elektroporation konnte nachgewiesen werden, dass selbst in Zellen mit gleicher Gewebezugehörigkeit, aber unterschiedlichem Phänotyp und/oder Zytogenetik durch minimale Änderungen der Spannung, des Widerstandes und des Feldpotentials deutlich bessere Transfektionsraten erzielt wurden (Jordan et al., 2008).

Zur Überprüfung einer Suppression des Vigilin wurde dessen Protein-Expression mittels Western Blot über die Zeit kontrolliert. Eine Kontrolle auf mRNA-Ebene erfolgte nicht, da davon auszugehen war, dass durch Degradierung mittels RNA-Interferenz die Vigilin-mRNA-Konzentration deutlich abnimmt, und somit keine Translation in das funktionelle Vigilin-Protein erfolgt. Im Gegensatz zu den transfizierten Zellen der Zelllinie HL60 konnte in den Zellen der Zelllinie NB4 eine Abnahme der Vigilinexpression der mit der spezifischen siRNA transfizierten Zellen, im Vergleich zu denen, die mit der unspezifischen siRNA transfizierten Zellen, insbesondere zu den Messzeitpunkten 48 und 72 Stunden, gesehen werden. Inwieweit dies auf ein methodisches Problem oder den unterschiedlichen Phänotyp der beiden Zelllinien zurück zu führen ist, ist zu diesem Zeitpunkt noch unklar. Bekannt ist, dass der, der PML zugrundeliegende Pathomechanismus des fehlregulierten ATRA-Rezeptors für eine Proliferationsinduktion in diesen Leukämiezellen verantwortlich ist. Durch Rekrutierung von Histon-Deacetylasen kommt es zur Bildung von Heterochromatin, und somit zu einer Transkriptionshemmung mit folgendem Differenzierungsarrest und Bildung eines malignen Zellklons (Grignani et al., 1998). Darauf aufbauende Untersuchungen ergaben Hinweise, dass weitere Mechanismen zur Transkriptionshemmung durch den mutierten ATRA-Rezeptor eine wesentliche Rolle spielen (Ozpolat et al., 2007; Segalla et al., 2003). Es könnte also anzunehmen sein, dass eine Vigilinhemmung mittels siRNA in Zellen die den mutierten ATRA-Rezeptor tragen, durch weitere Signalwege und posttranskriptionelle und posttranslationale Vorgänge beeinflusst wird.

Eine weitere Erklärung der reduzierten Vigilinproteinsynthese in den NB4-Zellen könnte die zentrale Stellung von Hsp90 und der von diesem Chaperone vermittelten Stimulierung des Transkriptionsfaktors NF/κB in dieser Zelllinie darstellen (Jiang et

al., 2011; Reikvam et al., 2009). Wie anfangs erwähnt zeigten neuere Untersuchungen eine zentrale Rolle von Hsp90 für die RNA-Interferenz. Es könnte also in den Zellen der Zelllinie NB4 aufgrund einer aktiveren Chaperone-Wirkung von Hsp90 zu einer effektiveren Hemmung durch die Vigilin-siRNA gekommen sein. Ob diese Annahme Bestand hat, müssen weitere Untersuchungen bezüglich der Steigerung der Effektivität der induzierten RNA-Interferenz klären.

Zur Kontrolle des Einflusses der Vigilinhemmung auf den Metabolismus und somit auch auf die Proliferationsrate der transfizierten Zellen wurden diese zu den festgelegten Zeitpunkten gezählt und eine Kontrolle des aktiven Metabolismus mittels des WST1-Tests durchgeführt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, weder in der Zelllinie HL60 noch NB4, in der Aktivität der Atmungskette und der Proliferationsaktivität der mit der spezifischen siRNA transfizierten Zellen gegenüber der Kontrolle und den Zellen die mit der unspezifischen siRNA behandelt wurden. Auch wenn gezeigt wurde dass eine Vigilinhemmung in der Zelllinie NB4 erfolgte, hatte diese doch keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen. Auch in der genaueren Analyse zur Unterscheidung frühapoptotischer und nekrotischer Zellen zeigen sich in beiden untersuchten Zelllinien keine Unterschiede zwischen der Kontrolle bzw. den Zellen die mit der unspezifischen siRNA behandelt wurden und den Zellen, die mit der Vigilin-siRNA transfiziert wurden. Somit können unspezifische Effekte der Transfektion und/oder der induzierten RNA-Interferenz, wie zum Beispiel Aktivierung immunologischer Prozesse, ausgeschlossen werden (Forsbach et al., 2012).

Die in der Zellzählung, im WST1-Test und in der Durchflusszytometrie gemessenen signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ergeben sich statistisch, zeigten aber keinen Effekt auf zellulärer Ebene und sind wahrscheinlich zellbiologisch nicht signifikant.

Ein Ansatz zur Erklärung der fehlenden Vigilinhemmung könnten neuere Untersuchungen zur Wirkungsweise und Regulationsmechanismen der Wirkung der RNA-Interferenz durch siRNA liefern. Es konnte gezeigt werden dass die Effektivität der RNA-Interferenz vom Ausmaß der Expression der Zielsequenz abhängt. Je stärker das kodierte Protein synthetisiert wird, umso größer ist der Effekt der RNA-Interferenz (Hong et al., 2014). Ebenso zeigen sich auch Unterschiede in der Sensibilität der Zelllinien gegenüber dem genutzten Mediator zum Erreichen der

RNA-Interferenz. Es gibt Hinweise dass bestimmte Zellen eine effektivere Hemmung der Proteinexpression durch lange doppelsträngige RNA (dsRNA) zeigen als durch siRNA (Barry et al., 2013; Wang et al., 2013). An welche Ausgangsbedingungen in der Zielzelle das geknüpft ist, beispielsweise Gewebetyp, Zielprotein oder Variabilität der Zielsequenz ist momentan noch unklar, und bedarf weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmalig eine Expression der Vigilin-mRNA und des Vigilinproteins in Zellen der akuten myeloischen Leukämie in Zelllinien und in *de novo*-Blasten gezeigt werden. Mittels Elektroporation konnte eine effektive Transfektion der Vigilin-siRNA in die Zielzelle erreicht werden. Allerdings erfolgte keine wirksame Hemmung der Vigilinproteinsynthese und somit keine, wie anfangs angenommen, Hemmung der Proliferationsaktivität der Zielzelle durch Apoptose-Induktion. Ob das an genetischen oder, wie bei der Zelllinie NB4 vermutet, an molekulargenetischen Eigenschaften, oder an einer für AML-Zelllinien ineffektiven RNA-Interferenz liegt, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Somit kann, aufgrund dieser Arbeit, die Annahme, dass Vigilin ein potentiell therapeutisch nutzbares Zielprotein in Zellen der AML sein könnte, nicht gestützt werden.

5 Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie im Erwachsenenalter ist trotz ständiger Weiterentwicklung der Therapiestrategien und Entwicklung neuer zielgerichteter Medikamente eine maligne Systemerkrankung in dessen Behandlungsverlauf, abhängig vom Subtyp und der Risikoeinteilung, nur mäßige Heilungsraten und oft auch nur kurze progressionsfreie Intervalle erreicht werden.

Vigilin nimmt unter den KH-Domänen-Proteinen eine Sonderstellung ein und ist Bestandteil eines Ribonukleoproteinkomplexes, der nach Bindung an die tRNA, diese aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Vigilin wurde in vielen Geweben und Tumorzellen nachgewiesen. In früheren Versuchen führte eine Hemmung der Expression des Proteins zu einer veränderten Syntheseleistung, Hemmung des Wachstums und zu einer gesteigerten Apoptose. Vorversuche an Zelllinien der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) zeigten keine Hemmung des Vigilins durch RNA-Interferenz, und somit erfolgte auch keine Veränderung der Proliferationsaktivität in diesen Zellen. Ob Vigilin in Zellen der akuten myeloischen Leukämie exprimiert wird, und eine Hemmung einen Effekt auf das Wachstumsverhalten dieser Zellen hat, ist bisher noch unklar.

Vigilin konnte in den Zelllinien HL60 und NB4, sowie in *de novo* AML-Blasten auf mRNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgte mittels PCR und Western Blot. Die Bedeutung des Proteins und sein Einfluss auf den Metabolismus und das Wachstum von AML-Zellen sollte durch den Regulationsmechanismus der RNA-Interferenz geklärt werden. Hierzu wurde eine spezifische siRNA in Zellen der AML-Zelllinien HL60 und NB4 durch Elektroporation transfiziert. Eine geringe Hemmung der Vigilinproteinexpression konnte über einen Zeitraum von 96 Stunden nur in der Zelllinie NB4 zu den Messzeitpunkten 48 und 72 Stunden gezeigt werden. Allerdings hatte dies keinen Einfluss auf die durch den WST1-Test ermittelte metabolische Aktivität oder durch Zellzählung bestimmte Proliferationsrate. Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch in den Zellen der Zelllinie HL60, in denen keine Hemmung der Vigilinproteinexpression gelang. Eine Erhöhung der Apoptoserate, wie sie in soliden Tumorzellen nach Ausschaltung des Vigilins beschrieben ist, konnte ebenfalls nicht gezeigt werden. Die durchflusszytometrische Analyse unter Verwendung von Annexin V und Propidiumiodid, zeigte keinen signifikanten Unterschied im Anteil der frühapoptotischen Zellen gegenüber den

spätapoptotischen/nekrotischen Zellen zwischen den mit der Vigilin-siRNA transfizierten Zellen und den beiden Kontrollgruppen.

Abschließend zeigt diese Arbeit, dass eine Vigilinhemmung in Zellen der AML, die als Suspensionszellen vorliegen, im Gegensatz zu den an soliden Tumorzellen gemachten Beobachtungen, kaum oder nur partiell gelingt, und auch eine erfolgreiche Ausschaltung keinen Einfluss auf die Proliferationsaktivität hat. Folgeuntersuchungen müssen nun zeigen welche Ursachen einer ineffektiven RNA-Interferenz zugrunde liegen, um diese zu optimieren.

6 Thesen

1. Die akute myeloische Leukämie ist eine maligne hämatologische Systemerkrankung die zur Zeit nur durch eine Polychemotherapie oder eine allogene Stammzelltransplantation heilbar ist.
2. Gezielte Therapeutika, im Sinne einer signalwegspezifischen Therapie (targeted therapy), sind zur Zeit nicht vorhanden.
3. Das Multi-KH-Domänen-Protein Vigilin ist an entscheidenden mRNA- und tRNA-Transportvorgängen beteiligt.
4. Eine Überexpression dieses Proteins wurde bereits in einigen Tumorzelllinien nachgewiesen und könnte auch bei Zellen der akuten myeloischen Leukämie vorliegen.
5. Eine Hemmung in Zelllinien einer Larynxkarzinomzelllinie (HEp2) und einer Cervixkarzinomzelllinie (HeLa) führten zu signifikanten Proteinsyntheseveränderungen.
6. Vigilin ist in Zellen mit ausgeprägter Proteinsyntheseleistung überexprimiert.
7. Es wird die Hypothese untersucht, dass die Hemmung der Vigilinsynthese in Zellen der akuten myeloischen Leukämie zu einer Änderung der Proliferationsrate des malignen Zellklons führt.
8. Bei verminderter Proteinsynthese durch den fehlenden mRNA- und tRNA-Transport können essentielle Stoffwechselwege der Zelle nicht mehr aufrecht erhalten werden und die Zelle leitet folglich die Apoptose ein.
9. Die Methode der RNA-Interferenz ist ein natürlich ubiquitär vorkommender Mechanismus zur Genregulation in eukaryoten Zellen.
10. Suspensionszellen lassen sich, im Vergleich zu adhärennten Zellen, schwerer transfizieren.
11. Die effektivste Methode zur Transfektion von siRNA in Suspensionszellen ist die Elektroporation.

12. Zur Ermittlung einer ausreichenden Herunterregulierung des Vigilingens ist der negative Nachweis mittels des Western Blot eine ideale Methode.
13. Um den Effekt der fehlenden Vigilinexpression zu validieren, sollte die Zellzahl der an sich rasch proliferierenden AML-Zelllinien HL60 und NB4, über die Zeit abnehmen bzw. zumindest stagnieren.
14. Einer Abnahme der Proliferationsaktivität geht eine Verminderung des Metabolismus der AML-Zelllinien HL60 und NB4 voraus. Diese kann mit dem WST1-Test objektiviert werden.
15. Sollte Vigilin, im Gegensatz zu den Tumorzelllinien HEP2 und HeLa, in den AML-Zelllinien HL60 und NB4 nicht exprimiert sein, wird eine Hemmung der Vigilinexpression keinen Effekt zeigen.
16. Sollte trotz Überexpression und erfolgreicher Herunterregulierung des Vigilingens in den AML-Zelllinien HL60 und NB4 kein Effekt messbar sein, ist anzunehmen dass Vigilin keinen entscheidenden Einfluss auf den Metabolismus und/oder die Proliferationsaktivität in diesen Zelllinien hat.
17. Eine Hemmung des Vigilingens mittels RNA-Interferenz in den AML-Zelllinien HL60 und NB4 kann zu einem gesteigerten Metabolismus und/oder einer gesteigerten Proliferationsaktivität führen.
18. Signifikante Veränderungen im Metabolismus der Zielzelle, die durch eine Hemmung des Vigilingens bedingt sind, können therapeutische Ansätze in der Behandlung maligner Erkrankungen darstellen.

7 Literaturverzeichnis

- Abáigar, M., F. Ramos, R. Benito, M. Díez-Campelo, J. Sánchez-Del-Real, L. Hermosín, J. N. Rodríguez, C. Aguilar, I. Recio, J. M. Alonso, N. de Las Heras, M. Megido, M. Fuertes, M. C. Del Cañizo, and J. M. Hernández-Rivas, 2013, Prognostic impact of the number of methylated genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias treated with azacytidine: *Ann Hematol*.
- Alfred Pingoud, C. U., 1999, *Arbeitsmethoden der Biochemie*, De Gruyter.
- Andree, H. A., C. P. Reutelingsperger, R. Hauptmann, H. C. Hemker, W. T. Hermens, and G. M. Willems, 1990, Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers: *J Biol Chem*, v. 265, p. 4923-8.
- Appelbaum, F. R., H. Gundacker, D. R. Head, M. L. Slovak, C. L. Willman, J. E. Godwin, J. E. Anderson, and S. H. Petersdorf, 2006, Age and acute myeloid leukemia: *Blood*, v. 107, p. 3481-5.
- Barry, G., P. Alberdi, E. Schnettler, S. Weisheit, A. Kohl, J. K. Fazakerley, and L. Bell-Sakyi, 2013, Gene silencing in tick cell lines using small interfering or long double-stranded RNA: *Exp Appl Acarol*, v. 59, p. 319-38.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond, and G. J. Hannon, 2001, Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference: *Nature*, v. 409, p. 363-6.
- Cai, P., X. Piao, N. Hou, S. Liu, H. Wang, and Q. Chen, 2012, Identification and characterization of argonaute protein, Ago2 and its associated small RNAs in *Schistosoma japonicum*: *PLoS Negl Trop Dis*, v. 6, p. e1745.
- Califano, J., P. van der Riet, W. Westra, H. Nawroz, G. Clayman, S. Piantadosi, R. Corio, D. Lee, B. Greenberg, W. Koch, and D. Sidransky, 1996, Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization: *Cancer Res*, v. 56, p. 2488-92.
- Caplen, N. J., S. Parrish, F. Imani, A. Fire, and R. A. Morgan, 2001, Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, p. 9742-7.
- Castiglione Morelli, M. A., G. Stier, T. Gibson, C. Joseph, G. Musco, A. Pastore, and G. Travè, 1995, The KH module has an alpha beta fold: *FEBS Lett*, v. 358, p. 193-8.
- Cho, E. K., S. M. Bang, J. Y. Ahn, S. M. Yoo, P. W. Park, Y. H. Seo, D. B. Shin, and J. H. Lee, 2003, Prognostic value of AML 1/ETO fusion transcripts in patients with acute myelogenous leukemia: *Korean J Intern Med*, v. 18, p. 13-20.
- Conrad, C., O. Janssen, G. Schäffner, and D. Kabelitz, 1999, Potency testing of anti-lymphocyte globulins: in vitro alternatives for the monkey skin graft assay: *Dev Biol Stand*, v. 101, p. 113-8.
- Cortés, A., D. Huertas, L. Fanti, S. Pimpinelli, F. X. Marsellach, B. Piña, and F. Azorín, 1999, DDP1, a single-stranded nucleic acid-binding protein of *Drosophila*, associates with pericentric heterochromatin and is functionally homologous to the yeast Scp160p, which is involved in the control of cell ploidy: *EMBO J*, v. 18, p. 3820-33.

- Darnell, R. B., 2013, RNA Protein Interaction in Neurons: *Annu Rev Neurosci*.
- De Boulle, K., A. J. Verkerk, E. Reyniers, L. Vits, J. Hendrickx, B. Van Roy, F. Van den Bos, E. de Graaff, B. A. Oostra, and P. J. Willems, 1993, A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation: *Nat Genet*, v. 3, p. 31-5.
- Dirks, W. G., and H. G. Drexler, 2004, Authentication of cancer cell lines by DNA fingerprinting: *Methods Mol Med*, v. 88, p. 43-55.
- Dodson, R. E., and D. J. Shapiro, 2002, Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization: *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, v. 72, p. 129-64.
- Duan, S. W., L. Wei, W. L. Yang, K. F. Chen, W. Q. Huang, and Y. Qin, 2011, [Expression of vigilin in cell lines and human hepatocellular carcinoma]: *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, v. 42, p. 170-3.
- Duprez, E., S. Ruchaud, G. Houge, V. Martin-Thouvenin, F. Valensi, P. Kastner, R. Berger, and M. Lanotte, 1992, A retinoid acid 'resistant' t(15;17) acute promyelocytic leukemia cell line: isolation, morphological, immunological, and molecular features: *Leukemia*, v. 6, p. 1281-7.
- Estey, E. H., 2013, Epigenetics in clinical practice: the examples of azacitidine and decitabine in myelodysplasia and acute myeloid leukemia: *Leukemia*, v. 27, p. 1803-12.
- Fire, A., 1999, RNA-triggered gene silencing: *Trends Genet*, v. 15, p. 358-63.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello, 1998, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*: *Nature*, v. 391, p. 806-11.
- Forsbach, A., C. Müller, C. Montino, A. Kritzler, R. Curdt, A. Benahmed, M. Jurk, and J. Vollmer, 2012, Impact of delivery systems on siRNA immune activation and RNA interference: *Immunol Lett*, v. 141, p. 169-80.
- Freund, M., 2008, *Praktikum der mikroskopischen Hämatologie*, 142 p.
- Fuchs, R., and P. Staib, 2010, *Manual Hämatologie*.
- Gibson, T. J., J. D. Thompson, and J. Heringa, 1993, The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid: *FEBS Lett*, v. 324, p. 361-6.
- Goolsby, K. M., and D. J. Shapiro, 2003, RNAi-mediated depletion of the 15 KH domain protein, vigilin, induces death of dividing and non-dividing human cells but does not initially inhibit protein synthesis: *Nucleic Acids Res*, v. 31, p. 5644-53.
- Grignani, F., S. De Matteis, C. Nervi, L. Tomassoni, V. Gelmetti, M. Ciocce, M. Fanelli, M. Ruthardt, F. F. Ferrara, I. Zamir, C. Seiser, M. A. Lazar, S. Minucci, and P. G. Pelicci, 1998, Fusion proteins of the retinoic acid receptor- α recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia: *Nature*, v. 391, p. 815-8.
- Hilgendorf, I., O. Gellersen, J. Emmrich, U. Mikkat, J. Rohwedel, H. J. Krammer, P. K. Muller, and C. Kruse, 2001, Estradiol has a direct impact on the exocrine pancreas as demonstrated by enzyme and vigilin expression: *Pancreatology*, v. 1, p. 24-9.

- Hong, S. W., Y. Jiang, S. Kim, C. J. Li, and D. K. Lee, 2014, Target Gene Abundance Contributes to the Efficiency of siRNA-Mediated Gene Silencing: *Nucleic Acid Ther.*
- Iwasaki, S., M. Kobayashi, M. Yoda, Y. Sakaguchi, S. Katsuma, T. Suzuki, and Y. Tomari, 2010, Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes: *Mol Cell*, v. 39, p. 292-9.
- Jiang, Q., Y. Wang, T. Li, K. Shi, Z. Li, Y. Ma, F. Li, H. Luo, Y. Yang, and C. Xu, 2011, Heat shock protein 90-mediated inactivation of nuclear factor- κ B switches autophagy to apoptosis through becn1 transcriptional inhibition in selenite-induced NB4 cells: *Mol Biol Cell*, v. 22, p. 1167-80.
- Jordan, E. T., M. Collins, J. Terefe, L. Ugozzoli, and T. Rubio, 2008, Optimizing electroporation conditions in primary and other difficult-to-transfect cells: *J Biomol Tech*, v. 19, p. 328-34.
- Juliusson, G., P. Antunovic, A. Derolf, S. Lehmann, L. Möllgård, D. Stockelberg, U. Tidefelt, A. Wahlin, and M. Höglund, 2009, Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry: *Blood*, v. 113, p. 4179-87.
- Kleppe, K., E. Ohtsuka, R. Kleppe, I. Molineux, and H. G. Khorana, 1971, Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases: *J Mol Biol*, v. 56, p. 341-61.
- Koopman, G., C. P. Reutelingsperger, G. A. Kuijten, R. M. Keehnen, S. T. Pals, and M. H. van Oers, 1994, Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis: *Blood*, v. 84, p. 1415-20.
- Kotewicz, M. L., C. M. Sampson, J. M. D'Alessio, and G. F. Gerard, 1988, Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity: *Nucleic Acids Res*, v. 16, p. 265-77.
- Kruse, C., A. Grunweller, D. K. Willkomm, T. Pfeiffer, R. K. Hartmann, and P. K. Muller, 1998, tRNA is entrapped in similar, but distinct, nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein complexes, both of which contain vigilin and elongation factor 1 alpha: *Biochem J*, v. 329 (Pt 3), p. 615-21.
- Kruse, C., D. K. Willkomm, A. Grunweller, T. Vollbrandt, S. Sommer, S. Busch, T. Pfeiffer, J. Brinkmann, R. K. Hartmann, and P. K. Muller, 2000, Export and transport of tRNA are coupled to a multi-protein complex: *Biochem J*, v. 346 Pt 1, p. 107-15.
- Kugler, S., A. Grunweller, C. Probst, M. Klinger, P. K. Muller, and C. Kruse, 1996, Vigilin contains a functional nuclear localisation sequence and is present in both the cytoplasm and the nucleus: *FEBS Lett*, v. 382, p. 330-4.
- Kuriyama, K., 2009, [Classification of myeloid leukemias]: *Nihon Rinsho*, v. 67, p. 1853-62.
- Lanotte, M., V. Martin-Thouvenin, S. Najman, P. Balerini, F. Valensi, and R. Berger, 1991, NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3): *Blood*, v. 77, p. 1080-6.
- Lee, K. H., M. Y. Chang, J. I. Ahn, D. H. Yu, S. S. Jung, J. H. Choi, Y. H. Noh, Y. S. Lee, and M. J. Ahn, 2002, Differential gene expression in retinoic acid-induced

- differentiation of acute promyelocytic leukemia cells, NB4 and HL-60 cells: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 296, p. 1125-33.
- Leupin, N., A. Kuhn, B. Hügli, T. J. Grob, R. Jaggi, A. Tobler, M. Delorenzi, and M. F. Fey, 2006, Gene expression profiling reveals consistent differences between clinical samples of human leukaemias and their model cell lines: *Br J Haematol*, v. 135, p. 520-3.
- Lu, S. H., A. H. Jeon, G. Schmitt-Ulms, S. Qamar, R. Dodd, B. McDonald, Y. Li, W. Meadows, K. Cox, C. Bohm, F. Chen, P. Fraser, and P. S. George-Hyslop, 2012, Vigilin interacts with signal peptide peptidase: *Proteome Sci*, v. 10, p. 33.
- Matunis, M. J., W. M. Michael, and G. Dreyfuss, 1992, Characterization and primary structure of the poly(C)-binding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K protein: *Mol Cell Biol*, v. 12, p. 164-71.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich, 1986, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, v. 51 Pt 1, p. 263-73.
- Musco, G., G. Stier, C. Joseph, M. A. Castiglione Morelli, M. Nilges, T. J. Gibson, and A. Pastore, 1996, Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome: *Cell*, v. 85, p. 237-45.
- Musselman, J. R., C. K. Blair, J. R. Cerhan, P. Nguyen, B. Hirsch, and J. A. Ross, 2013, Risk of adult acute and chronic myeloid leukemia with cigarette smoking and cessation: *Cancer Epidemiol*, v. 37, p. 410-6.
- Naarmann-de Vries, I. S., H. Urlaub, D. H. Ostareck, and A. Ostareck-Lederer, 2013, Caspase-3 cleaves hnRNP K in erythroid differentiation: *Cell Death Dis*, v. 4, p. e548.
- Nelson-Rees, W. A., D. W. Daniels, and R. R. Flandermeyer, 1981, Cross-contamination of cells in culture: *Science*, v. 212, p. 446-52.
- Nennecke, A., A. Wienecke, and K. Kraywinkel, 2014, [Leukemia incidence and survival in Germany according to current standardized categories]: *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, v. 57, p. 93-102.
- Neu-Yilik, G., H. Zorbas, T. R. Gloe, H. M. Raabe, T. A. Hopp-Christensen, and P. K. Muller, 1993, Vigilin is a cytoplasmic protein. A study on its expression in primary cells and in established cell lines of different species: *Eur J Biochem*, v. 213, p. 727-36.
- Noland, C. L., and J. A. Doudna, 2013, Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways: *RNA*, v. 19, p. 639-48.
- Ovcharenko, D., R. Jarvis, S. Hunicke-Smith, K. Kelnar, and D. Brown, 2005, High-throughput RNAi screening in vitro: from cell lines to primary cells: *RNA*, v. 11, p. 985-93.
- Ozpolat, B., U. Akar, M. Steiner, I. Zorrilla-Calancha, M. Tirado-Gomez, N. Colburn, M. Danilenko, S. Kornblau, and G. L. Berestein, 2007, Programmed cell death-4 tumor suppressor protein contributes to retinoic acid-induced terminal granulocytic differentiation of human myeloid leukemia cells: *Mol Cancer Res*, v. 5, p. 95-108.

- Pulsoni, A., S. Iacobelli, M. Bernardi, M. Borgia, A. Camera, N. Cantore, F. Di Raimondo, P. Fazi, F. Ferrara, F. Leoni, V. Liso, M. Mancini, F. Marmont, A. Matturro, L. Maurillo, L. Melillo, G. Meloni, S. Mirto, G. Specchia, C. G. Valentini, A. Venditti, G. Leone, R. Foà, F. Mandelli, and L. Pagano, 2008, M4 acute myeloid leukemia: the role of eosinophilia and cytogenetics in treatment response and survival. *The GIMEMA experience: Haematologica*, v. 93, p. 1025-32.
- Reikvam, H., A. M. Olsnes, B. T. Gjertsen, E. Ersvar, and O. Bruserud, 2009, Nuclear Factor-kappaB Signaling: A Contributor in Leukemogenesis and a Target for Pharmacological Intervention in Human Acute Myelogenous Leukemia: *Crit Rev Oncog*, v. 15, p. 1-36.
- Renart, J., J. Reiser, and G. R. Stark, 1979, Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 76, p. 3116-20.
- Richard, S., 2010, Reaching for the stars: Linking RNA binding proteins to diseases: *Adv Exp Med Biol*, v. 693, p. 142-57.
- Rohwedel, J., S. Kugler, T. Engebrecht, W. Purschke, P. K. Muller, and C. Kruse, 2003, Evidence for posttranscriptional regulation of the multi K homology domain protein vigilin by a small peptide encoded in the 5' leader sequence: *Cell Mol Life Sci*, v. 60, p. 1705-15.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich, 1988, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase: *Science*, v. 239, p. 487-91.
- Schmidt, C., B. Henkel, E. Pöschl, H. Zorbas, W. G. Purschke, T. R. Gloe, and P. K. Müller, 1992, Complete cDNA sequence of chicken vigilin, a novel protein with amplified and evolutionary conserved domains: *Eur J Biochem*, v. 206, p. 625-34.
- Schuh, A., K. Assmuth, I. Hilgendorf, P. K. Mueller, and C. Kruse, 2003, Protein synthesis of eucaryotic cells could be decreased by antisense-DNA of the multi KH domain protein vigilin: *Int J Mol Med*, v. 12, p. 35-43.
- Schult, C., 2008, Untersuchungen zur Expression und funktionellen Bedeutung des KH-Homologs und RNA-Transporter-Proteins Vigilin bei akuten lymphatischen Leukämien mittels siRNA. Diplomarbeit an der Universität Rostock.
- Segalla, S., L. Rinaldi, C. Kilstrup-Nielsen, G. Badaracco, S. Minucci, P. G. Pelicci, and N. Landsberger, 2003, Retinoic acid receptor alpha fusion to PML affects its transcriptional and chromatin-remodeling properties: *Mol Cell Biol*, v. 23, p. 8795-808.
- Siomi, H., M. Choi, M. C. Siomi, R. L. Nussbaum, and G. Dreyfuss, 1994, Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome: *Cell*, v. 77, p. 33-9.
- Siomi, H., and G. Dreyfuss, 1997, RNA-binding proteins as regulators of gene expression: *Curr Opin Genet Dev*, v. 7, p. 345-53.
- Siomi, H., M. J. Matunis, W. M. Michael, and G. Dreyfuss, 1993, The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif: *Nucleic Acids Res*, v. 21, p. 1193-8.

- Southam, C. M., L. F. Craver, H. W. Dargeon, and J. H. Burchenal, 1951, A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions: *Cancer*, v. 4, p. 39-59.
- Stalder, L., W. Heusermann, L. Sokol, D. Trojer, J. Wirz, J. Hean, A. Fritzsche, F. Aeschmann, V. Pfanzagl, P. Basselet, J. Weiler, M. Hintersteiner, D. V. Morrissey, and N. C. Meisner-Kober, 2013, The rough endoplasmatic reticulum is a central nucleation site of siRNA-mediated RNA silencing: *EMBO J*, v. 32, p. 1115-27.
- Tabara, H., M. Sarkissian, W. G. Kelly, J. Fleenor, A. Grishok, L. Timmons, A. Fire, and C. C. Mello, 1999, The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*: *Cell*, v. 99, p. 123-32.
- Tait, J. F., D. Gibson, and K. Fujikawa, 1989, Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family: *J Biol Chem*, v. 264, p. 7944-9.
- Teissie, J., and M. Golzio, 2014, Direct Imaging of siRNA Electrotransfer at the Single-Cell Level: *Methods Mol Biol*, v. 1121, p. 121-30.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, 1979, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 76, p. 4350-4.
- Verhoven, B., R. A. Schlegel, and P. Williamson, 1995, Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes: *J Exp Med*, v. 182, p. 1597-601.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger, 1995, A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V: *J Immunol Methods*, v. 184, p. 39-51.
- Walters, D. K., E. P. Stoffregen, M. C. Heinrich, M. W. Deininger, and B. J. Druker, 2005, RNAi-induced down-regulation of FLT3 expression in AML cell lines increases sensitivity to MLN518: *Blood*, v. 105, p. 2952-4.
- Wang, J., M. Wu, B. Wang, and Z. Han, 2013, Comparison of the RNA interference effects triggered by dsRNA and siRNA in *Tribolium castaneum*: *Pest Manag Sci*, v. 69, p. 781-6.
- Waterhouse, P. M., M. B. Wang, and E. J. Finnegan, 2001a, Role of short RNAs in gene silencing: *Trends Plant Sci*, v. 6, p. 297-301.
- Waterhouse, P. M., M. B. Wang, and T. Lough, 2001b, Gene silencing as an adaptive defence against viruses: *Nature*, v. 411, p. 834-42.
- Wei, J., S. Li, C. Wang, Y. W. Qin, X. X. Ma, K. C. Xie, S. K. Yan, Y. R. Gao, and Q. Cai, 2008, [Inhibitory effect of Rnai on AML1 -ETO fusion gene expression in leukemia cells]: *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, v. 29, p. 607-10.
- Weinberg, O. K., M. Seetharam, L. Ren, K. Seo, L. Ma, J. D. Merker, J. Gotlib, J. L. Zehnder, and D. A. Arber, 2009, Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system: *Blood*, v. 113, p. 1906-8.

Wintersberger, U., C. Kühne, and A. Karwan, 1995, Scp160p, a new yeast protein associated with the nuclear membrane and the endoplasmic reticulum, is necessary for maintenance of exact ploidy: *Yeast*, v. 11, p. 929-44.

Woo, H. H., X. Yi, T. Lamb, I. Menzl, T. Baker, D. J. Shapiro, and S. K. Chambers, 2011, Posttranscriptional suppression of proto-oncogene c-fms expression by vigilin in breast cancer: *Mol Cell Biol*, v. 31, p. 215-25.

Zwaal, R. F., and A. J. Schroit, 1997, Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells: *Blood*, v. 89, p. 1121-32.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Christian Junghanß für die Bereitstellung des Themas und die fachliche Betreuung dieser Arbeit danken.

Besonderen Dank gilt Frau PD Dr. med. Inken Hilgendorf für Ihre Unterstützung und Hilfestellungen zu dieser Arbeit, und Ihren Anregungen zur Optimierung.

Insbesondere möchte ich mich bei Frau Elisabeth Koppitz für Ihre Fürsorge, Hilfe und Geduld bei der Einarbeitung in die molekularbiologischen und grundlegenden technischen Methoden, die in dieser Arbeit Anwendung fanden, bedanken.

Frau Dr. rer. nat. Catrin Roof danke ich für die Anleitung im Bereich der Durchflusszytometrie und die vielen hilfreichen Anregungen zur optimalen Auswertung und Darstellungen der gesammelten Daten.

Ich bedanke mich bei der gesamten Arbeitsgruppe der Tumorummunologie und experimentellen Stammzelltransplantation für zahlreiche Ratschläge und Hinweise zu technischen und methodischen Problemen.

Ich danke Herrn PD Dr. rer. nat. habil. Hugo Murua Escobar für seine Korrekturen und Verbesserungsvorschläge

Herrn Prof. Dr. Charli Kruse danke ich für die Bereitstellung des Vigilin-Antikörpers und für die Hospitation zur Erlernung methodischer Grundlagen.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. Frank Lüthen für die Hilfe bei den Aufnahmen am konfokalen Laser-Rastermikroskop danken.

Ich danke Herrn Dr. Walzel für die Nutzung des Gene Pulsers.

Allen Probanden, die durch Ihre Bereitschaft zur Blutspende meine Arbeit unterstützt haben, danke ich vielmals.

Abschließend möchte ich meiner Familie danken, ohne deren stetige Unterstützung meines Handelns und Ihrer Rücksichtnahme, diese Arbeit und unzählige weitere große Dinge in meinem Leben nicht realisierbar gewesen wären.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mir ist bekannt, dass gemäß § 19, Abs. 1 der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock die Promotion wegen einer Pflichtwidrigkeit (Täuschung u.ä.) für nicht bestanden erklärt werden kann.

Rostock, den 20.03.2014

Christoph Wittke

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christoph Wittke
Anschrift: Kröpeliner Straße 72/73
in 18055 Rostock
Geburtstag und –ort: 10.09.1981 in Vielist
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

1988 – 1993 Grundschole Juri-Gagarin in Grabowhöfe
1992 – 2000 Erlangung der Hochschulreife am Richard-Wossidlo-Gymnasium in Waren (Müritz)

Grundwehrdienst

2000 – 2001 Grundwehrdienst in Neumünster und Boostedt im Transportzug Schleswig-Holstein des Transportbataillon 143

Studium

2001 – 2007 Erfolgreicher Abschluss des Studiums der Humanmedizin an der Universität Rostock

Beruflicher Werdegang

Seit 2007

Arzt in Weiterbildung zum Internisten
mit Schwerpunkt Hämatologie und
Onkologie in der Klinik III
(Hämatologie/Onkologie/
Palliativmedizin) des Zentrums für
Innere Medizin der
Universitätsmedizin Rostock

Rostock, den 20.03.2014

Christoph Wittke