

Dissertation

**Untersuchungen zur differentiellen  
Proteinexpression und Inhibition beim  
Malignen Pleuralen Mesotheliom**

eingereicht von

**Mag. rer. nat. Hannelore Elfriede Kothmaier**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der medizinischen Wissenschaft**

**(Dr. scient. med.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Institut für Pathologie**

unter der Anleitung von

**Prof. Dr. Helmut H. Popper**

Graz, 2008

---

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwende habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

Graz, September 2008

Hannelore Elfriede Kothmaier

1. Gutachter: Ao. Univ.-Prof. Dr. Helmut. H. Popper  
Leiter der Forschungseinheit Molekulare Lungen-  
und Pleurapathologie am Institut für Pathologie,  
Medizinischen Universität Graz
  
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Freyja M. Smolle-Jüttner,  
Leiterin der klinischen Abteilung für Thorax – und  
hyperbare Chirurgie, Medizinischen Universität Graz

Teile der vorliegenden Arbeit wurden im THORAX Journal publiziert:

**Kothmaier, H., et al.,** EGFR and PDGFR differentially promote growth  
in malignant epithelioid mesothelioma of short and long term survivors.

**Thorax, 2008. 63(4): p. 345-51.**

---

## **Danksagung**

### **Ich danke**

Herrn Prof. Dr. Helmut H. Popper für die Bereitstellung des interessanten Themas dieser Arbeit, die intensive Unterstützung und Betreuung, und ganz besonders für die hervorragende Zusammenarbeit in allen Phasen dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Freyja M. Smolle-Jüttner für die Betreuung und die Bereitschaft die Begutachtung dieser Arbeit zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Helmut Denk für die Unterstützung meiner Arbeit am Institut für Pathologie.

Allen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Pathologie für die freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft. Ganz besonders Frau Iris Halbwedl für ihre fachliche Unterstützung.

Herrn Dr. Franz Quehenberger vom Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Dokumentation für die gute Zusammenarbeit.

Meinen Freunden und Studienkollegen für die Diskussionsbereitschaft und den konstruktiven Ideenaustausch.

Meiner Familie ganz besonders aber meinen Eltern für die uneingeschränkte Unterstützung meines bisherigen Werdegangs.

---

Für Erich

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Maligne pleurale Mesotheliom</b>	<b>1</b>
1.1.1	Inzidenz und Überleben	2
<b>1.2</b>	<b>Ursachen für die Entstehung</b>	<b>4</b>
1.2.1	Asbest	4
1.2.2	Simian Virus 40	7
1.2.3	Erionit	7
1.2.4	Screening	9
<b>1.3</b>	<b>Pathomechanismen</b>	<b>9</b>
1.3.1	Chromosomale Aberrationen im MPM	10
1.3.2	Signaling Pathways	11
1.3.2.1	EGFR Pathway	12
1.3.2.2	PI3K/AKT, C-MET, und PDGFR Pathway	13
1.3.2.3	Einfluss der Wachstumsfaktoren	14
<b>1.4</b>	<b>Mechanismus der RNA-Interferenz</b>	<b>15</b>
1.4.1	siRNA	16
<b>1.5</b>	<b>Ziel der Studie</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Material Lösungen und Reagenzien allgemein</b>	<b>19</b>
2.1.1	Tissue-Microarray	19
2.1.2	RNA-Interferenz	22
2.1.3	Lösungen für die eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23
2.1.4	Lösungen für den Elektrotransfer der Proteine auf die PVDF Membran	25
2.1.5	Lösungen für die Inkubation der Antikörper	26
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>27</b>
2.2.1	Tissue-Microarray (TMA)	27
2.2.1.1	TMA Konstruktion	27
2.2.1.2	Immunhistochemische Untersuchungen (IHC)	28
2.2.1.3	Scoring	28
2.2.1.3	Statistische Auswertung	28
2.2.2	Zellbiologische Methoden	29
2.2.2.1	Allgemeines zur Kultivierung von humanen Zelllinien	29
2.2.2.2	Kultivierung der humanen Mesotheliomzelllinien	30
2.2.2.3	Kulturmedium	30
2.2.2.4	Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität	31

2.2.3	siRNA-Transfektion	32
2.2.3.1	CRL-5915 Transfektion mit Lipofectamine 2000	32
2.2.3.2	MSTO-211H Transfektion mit Lipofectamine 2000	34
2.2.4	RNA und Protein Extraktion aus siRNA transfizierten Zelllinien	36
2.2.4.1	RNA und Protein Extraktion	36
2.2.4.2	Bestimmung der RNA-Qualität	37
2.2.5	Genexpressions Analyse mit dem Human Whole Genome Array	38
2.2.5.1	cDNA-Synthese	39
2.2.5.2	Synthese der Fluoreszenz-markierten cRNA	40
2.2.5.3	cRNA Aufreinigung und Quantifizierung	41
2.2.5.4	Fragmentierung der cRNA	43
2.2.5.5	Hybridisierung auf dem Human Whole Genome Microarray Slides	43
2.2.5.5	Waschen und Stabilisieren der Slides	43
2.2.5.7	Signaldetektion	44
2.2.6	Proteinanalytik der Proteinextrakte aus den siRNA transfizierten CRL-5915 und MSTO-211H Zelllinien	45
2.2.6.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	45
2.2.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
2.2.6.3	Western Blot: Elektrotransfer der Proteine nach dem Semidry-System	46
2.2.6.4	Antikörper Inkubation	47
2.2.6.5	Detektion der Proteine	48
2.2.6.6	Strippen der PVDF-Membran	48
<b>3</b>	<b>Resultate</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchungen der Short-term survivors (STS) and long-term Survivors des malignen pleuralen Mesothelioms (MPM) am Tissue Microarray</b>	<b>49</b>
3.1.1	Auswertung der klinischen Daten	49
3.1.1.1	MIB-1/Ki-67 Proliferations Index im Mesotheliom	49
3.1.2	Statistische Analyse der immunhistochemischen Ergebnisse	51
3.1.2.1	Quantitativer Vergleich der Proteinexpression	51
3.1.2.2	Global Test Goeman's Global Test	54
3.1.2.3	Korrelationen Netzwerke	54
<b>3.2</b>	<b>siPCNA Transfektion in humanen Mesotheliomzelllinien</b>	<b>60</b>
3.2.1	Hintergrund PCNA (proliferating cell nuclear antigen)	60
3.2.2	Effizienz der siPCNA Sequenzen	62
3.2.3	Western Blot Analyse von siPCNA in Mesotheliomzelllinien	65

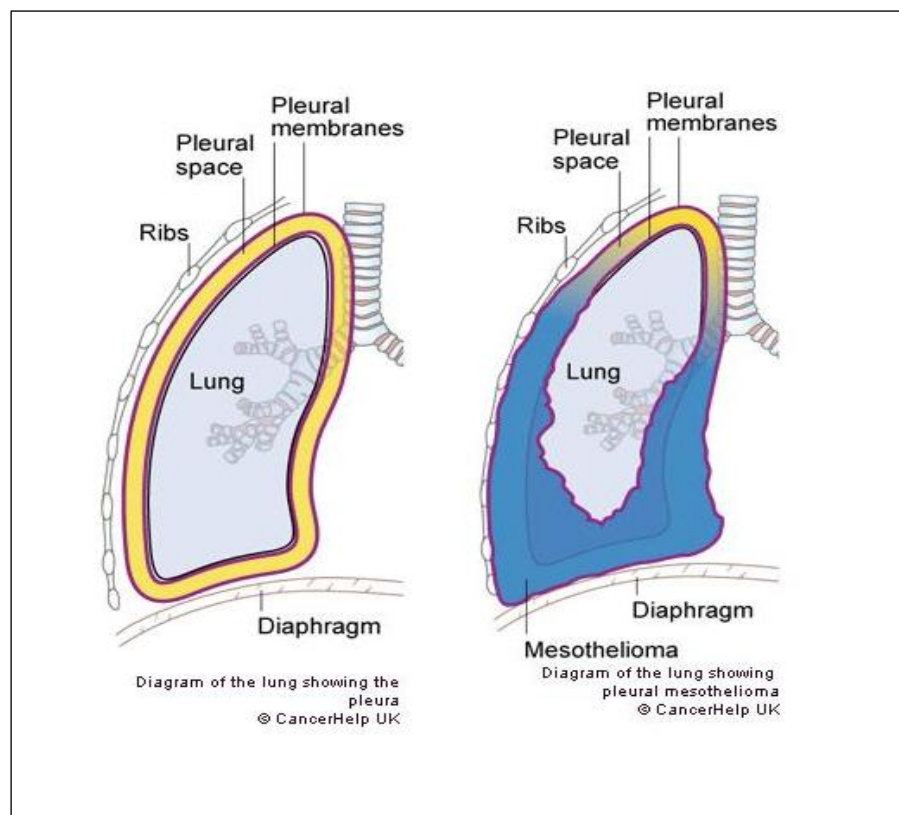
---

<b>3.3</b>	<b>Genexpressionsanalyse von siPCNA am Human Whole Genom Array</b>	<b>67</b>
3.3.1	Qualitätsreports der Arrays	67
3.3.2	Korrektur nach Bonferroni identifiziert deregulierte Gene	93
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>98</b>
<b>4.1</b>	<b>Signaling Pathways im malignen pleuralen Mesotheliom</b>	<b>98</b>
4.1.1	Epidermal Growth Faktor Rezeptor (EGFR) Signaling in den LTS	98
4.1.2	PDGFR Signaling in STS	100
4.1.3	Die Rolle von TIE2 in der Angiogenese im MPM	102
4.1.4	Anti-Apoptose durch Survivin und STAT1 in den STS	102
4.1.5	STAT1 und MECP2 - neue Protein in der Pathogenese des MPM	103
<b>4.2</b>	<b>siRNA-Interferenz</b>	<b>105</b>
4.2.1	siPCNA Knockdown in Mesotheliomzelllinien	106
<b>4.3</b>	<b>Ausblicke</b>	<b>109</b>
<b>5</b>	<b>Referenzen</b>	<b>110</b>
	<b>Anhang</b>	<b>115</b>
	<b>I.Abbildungsverzeichnis</b>	<b>115</b>
	<b>II.Tabellenverzeichnis</b>	<b>116</b>
	<b>III.Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>117</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Maligne pleurale Mesotheliom

Das maligne pleurale Mesotheliom (MPM) ist ein asbest-assoziiertes Tumor der Pleura (Abb.1). Unter einem malignen Mesotheliom versteht man im allgemeinen einen aggressiven, behandlungsresistenten Tumor der serösen Häute, wie der Pleura, des Peritoneums, des Perikards und der Tunica vaginalis testis. Während der überwiegende Anteil der malignen Mesotheliome von der Pleura ausgeht, wird die Häufigkeit der peritonealen Mesotheliome mit 5-17 % angegeben. Perikardmesotheliome hingegen sind eher selten.



**Abbildung 1. Das pleurale Mesotheliom.** Schematische Darstellung einer gesunden Pleura und einem pleuralen Mesotheliom ([www.cancerresearchuk.org](http://www.cancerresearchuk.org)).

---

Laut WHO Klassifikation 2004 unterscheidet man beim Mesotheliom drei Tumorsubtypen:

- **epitheloid**
- **sarkomatoid**
- **biphasisch**

Der **epitheloide Subtyp** zeichnet sich durch tubuläre, papilläre und zystische Strukturen in einem teils myxoiden Stroma aus, während beim **sarkomatoiden Typ** die Faserproduktion der spindelförmigen Zellen dominiert. Beim **biphasischen Typ** findet man beide Differenzierungsformen in unterschiedlicher Ausprägung [1]. Prozentuell gesehen gehören etwa 50% der MPM zum epitheloiden Typ, 30% zum biphasischen und die verbleibenden 20% zum sarkomatoiden Typ [2].

### **1.1.1 Inzidenz und Überleben**

Obwohl das MPM ein seltener Tumor ist, ist seine Inzidenz weltweit im steigen begriffen. Es wird prognostiziert, dass in Europa, Australien und Japan der Höhepunkt an MPM Fällen in den Jahren 2015 und 2025 erreicht wird, während in den USA dieser Höhepunkt bereits 2004 erreicht wurde (Abb.2) [3]. Die Latenzzeit, d.h. der Zeitraum zwischen Asbestexposition und Ausbruch der Krankheit, ist mit 15 bis 45 Jahren extrem lang. Somit ergibt sich ein kausaler Zusammenhang zwischen der steigenden Inzidenz und des oft extremen Asbesteinsatzes in den Jahren 1940-1979.

Table 1. Worldwide Trends in the Epidemiologic Features of Malignant Mesothelioma.*				
Country or Region	Incidence <i>cases/million population</i>	Predicted Peak Year	Predicted No. of Deaths in Next 40 Yr†	Predicted Cost‡ <i>billions of U.S. dollars</i>
United States	15	2004	72,000	200
Europe	18§	2015–2020	250,000	80
Japan	7	2025	103,000	—
Australia	40	2015	30,000	5–10

\* The sources of the data on the incidence (most recent figures), predicted peak year, and predicted number of deaths in the next 40 years are as follows: United States, Roushdy-Hammady et al.<sup>2</sup>; Europe, Pelin et al.<sup>3</sup>; Japan, Sebastien et al.<sup>4</sup>; and Australia, Wagner et al.<sup>5</sup> The sources of the data on predicted cost are as follows: United States, Shah and Williams<sup>6</sup>; Europe, Lee et al.<sup>7</sup>; and Australia, Wagner et al.<sup>5</sup> Costs for Japan are unknown.

† The predicted number of deaths is estimated from data on annual incidence and predicted peak year.

‡ The costs shown are for compensation only; health care costs are excluded.

§ The incidence, in number of cases per million population, is 33 in Great Britain, 30 in the Netherlands, 15 in Germany, 16 in France, and 19 in Italy (range in Europe, 15 to 33).

## Abbildung 2. Weltweite epidemiologische Entwicklungen des malignen Mesothelioms [3].

Die Lebenserwartung nach der Diagnosestellung ist hingegen sehr kurz. Die mittlere Lebenserwartung liegt bei Patienten mit und ohne Behandlung bei 4-12 Monaten [4]. Eine Kombination von Chemotherapie, Operation und evtl. Bestrahlung kann unter Umständen lebensverlängernd wirken. Eine Heilung ist heute aber noch nicht möglich. Nur eine kleine Zahl der Patienten (hauptsächlich zum epitheloiden Typ gehörend), ca. 10% überleben länger als 3 Jahre und ca. 3% länger als 5 Jahre [5]. Bis heute konnte noch nicht geklärt werden, welche Faktoren die Überlebensrate bei diesen Patienten positiv beeinflussen.

Anhand immunhistochemischer Untersuchungen der letzten Jahre konnte beim Mesotheliom gezeigt werden, dass hohe/niedrige Ki-67/MIB-1 [6], p27<sup>kip1</sup> [7], p21<sup>cip1</sup> und Cyclooxygenase-2 (COX-2) Werte Einfluss auf das Überleben dieser Patienten haben. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den immunhistochemischen Nachweis und dem Überleben konnte nicht restlos geklärt werden [5, 8].

---

## 1.2 Ursachen für die Entstehung

Das maligne Mesotheliom wurde bereits 1870 beschrieben, aber die Assoziation zwischen Asbest und Mesotheliom wurde erst 1960 von Wagner et al. bei asbestexponierten Minenarbeitern in Südafrika erkannt [9]. In 80-90% der Fälle liegt eine vorangegangene Asbestexposition zu Grunde. Weitere mögliche Ursachen für die Entstehung des MPMs sind der Simian Virus 40 (SV 40), Radiotherapie, Thorotrast (Röntgenkontrastmittel; Verwendung bis Mitte der 1950er Jahre) [10] und die Inhalation weiterer Silikat-Mineralen, wie Erionit (siehe unter 1.2.3).

Als Ursachen für die Entstehung des malignen Mesothelioms zu nennen sind:

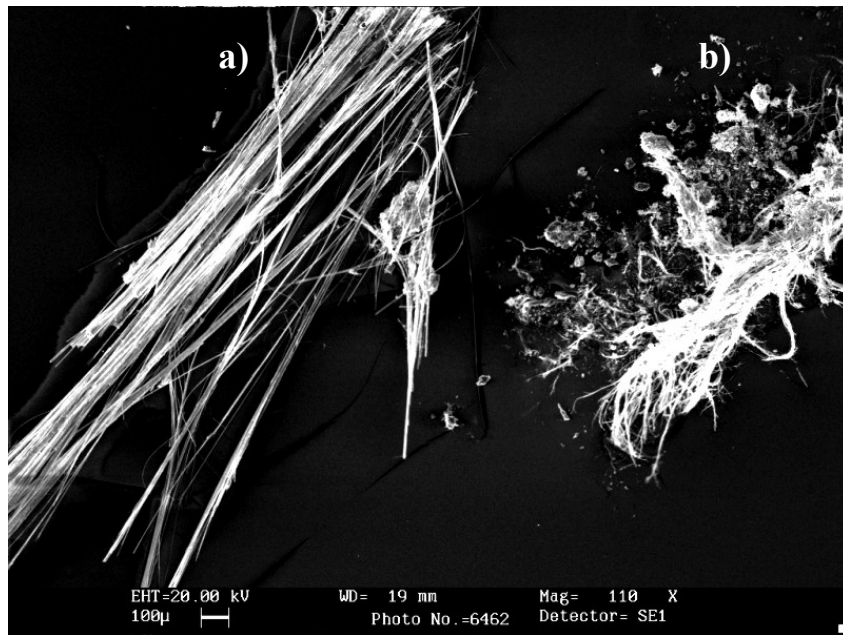
- **Asbest (in 80-90% der Fälle)**
- **SV40**
- **Erionit**

### 1.2.1 Asbest

Die Bezeichnung Asbest (asbestos altgriechisch „unzerstörbar, unvergänglich“) ist die Bezeichnung für eine Gruppe natürlich vorkommende, faserförmige Silikatminerale.

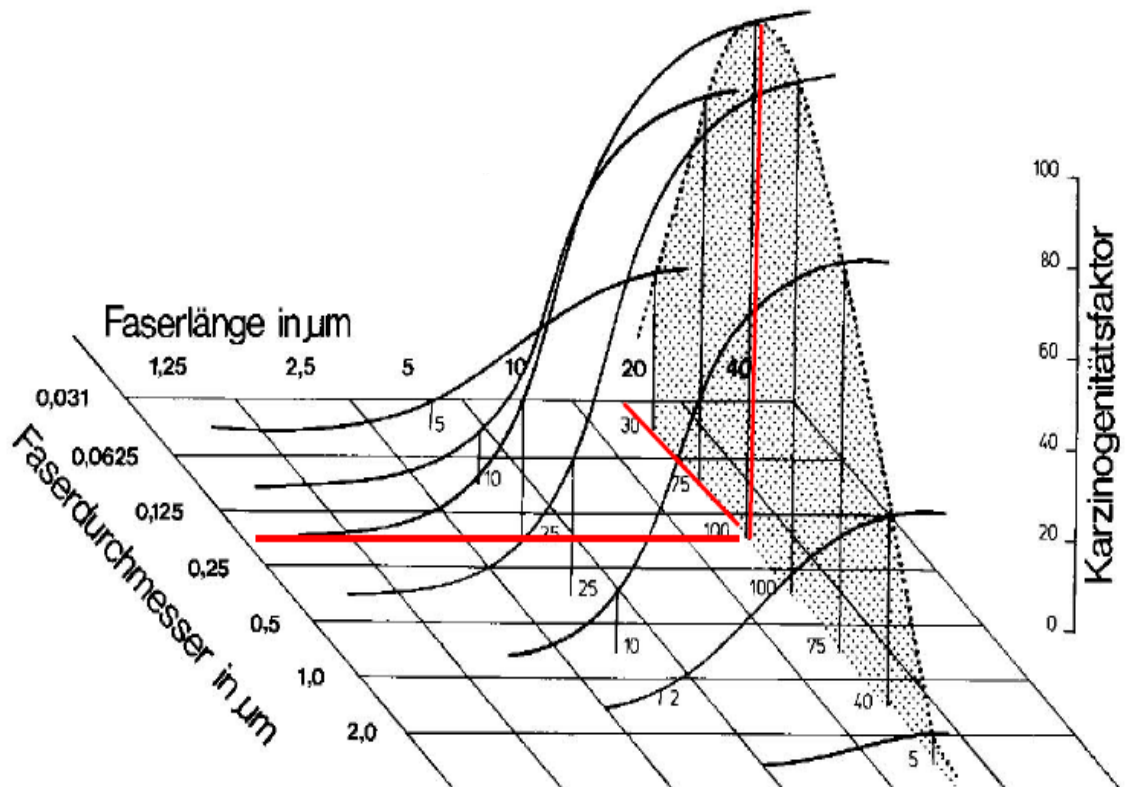
Morphologisch werden die sechs Fasertypen in zwei Subgruppen unterteilt (Abb.3):

1. **Gruppe der Serpentine (plastisch und gekräuselt):** Chrysotyl (Weißer Asbest), die industriell meist verwendete Asbestart.
2. **Gruppe der Amphibolen (rigide und stäbchenförmig):** Krokydolith (Blauer Asbest), Amosit (Brauner Asbest), Tremolit, Antophyllit und Actinololith.



**Abbildung 3. Asbestfasern.** Die Asbestfasern a) Krokydolith zur Gruppe der Amphibolen gehörend und b) Chrysotyl zur Gruppe der Serpentine im Rasterelektronenmikroskop.

Asbestfasern führen zu Irritationen der Pleura. Die Form der Fasern, das Verhältnis Länge zu Dicke der Fasern ist ausschlaggebend wie tief die Fasern in die Lunge penetrieren und in weitere Folge in die Pleura eindringen. Asbestfasern mit einer Länge von  $\sim 20\mu\text{m}$  und einem Durchmesser  $\sim 0,2\mu\text{m}$  besitzen ein hohes krebserzeugendes Potential wie in Abb.4 dargestellt [11].



**Abbildung 4. Hypothetische Häufigkeitsverteilung der Karzinogenität von Asbestfasern, in Abhängigkeit von Länge und Durchmesser (nach Pott [11]).** Asbestfasern mit einer Länge von  $\sim 20\mu\text{m}$  und einem Durchmesser  $\sim 0,2\mu\text{m}$  besitzen ein hohes krebserzeugendes Potential.

Asbest zeichnet sich durch hohe Belastbarkeit, Hitze- und Säurebeständigkeit, einfache Verarbeitung aus und eignet sich bestens für die Isolationszwecke. Aufgrund dieser außergewöhnlichen Eigenschaften fand Asbest in den USA und Europa Anwendung vor allem in der Schifffahrts-, Isolations-, Bau- und Autoreifenindustrie. Aufgrund des inzwischen eindeutig festgestellten Gesundheitsrisikos, das von Asbest ausgeht, ist der Einsatz heute in vielen Ländern verboten, unter anderem im gesamten EU-Raum. In Österreich ist der Import von Asbest seit 1990 verboten.

---

### **1.2.2 Simian Virus 40**

SV40, ein doppelsträngiger DNA-Virus, inhibiert Tumorsuppressorgene wie das Protein p53 und das Retinoblastomprotein, wurde in humanen und rodenten Zellen als onkogener Virus beschrieben. SV40 DNA-Sequenzen konnten in Hirn- und Knochentumoren, Non-Hodgkin Lymphomen, malignen Mesotheliomen, sowie atypischer mesothelialer Proliferationen und superficiale non-invasive Läsionen des Mesothels nachgewiesen werden [9].

Die Verbreitung des SV40 innerhalb der humanen Population erfolgte wahrscheinlich durch SV40-kontaminierten Salk Poliomyelitis Impfstoff in den Jahren zwischen 1955 und 1963. Trotz allem aber bleibt die Rolle von SV40, als potentieller karzinogener Faktor in der Pathogenese des MPMs umstritten. Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass die wie bisher angenommen hohe Vorkommen an SV40 im MPM (in 60% der Fälle) anscheinend durch falsch-positive Ergebnisse zustande gekommen ist. Der Grund dafür ist anscheinend auf Kontaminationen innerhalb der Labors zurück zu führen, weil weltweit wird und wurde mit Plasmiden gearbeitet, die SV40 Sequenzen enthalten. Da der SV40 Nachweis mittels PCR-Methoden erfolgte, erklärt es sich wodurch die hohe Zahl an falsch-positiven Ergebnissen zustande kam [12]. Asbest bleibt somit die Hauptursache für die Entstehung eines Mesothelioms.

### **1.2.3 Erionit**

Erst kürzlich wurde herausgefunden, dass Erionit, ein zur Zeolithgruppe zählendes Silikat-Mineral, zur Mesotheliomentstehung in genetisch prädispositionierten Menschen in der der Region Cappadocia (Türkei) beiträgt. Eine Studie deckte auf, dass in den Dörfern Karain and Tuzkoy die Diagnose Mesotheliom in mehr als 50% der

---

Dorfbewohner die Todesursache war [13]. Die Hauptursache für die hohe Inzidenz in mehr als der Hälfte der Dorfbewohner von Karain und Tuzkoy war vorerst Erionit, das in den Steinen vorkommt, die aus den nahegelegenen Steinbrüchen für die Errichtung der oben genannten Dörfer verwendet wurde.

Erst die Analyse eines aus 6-Generationen und 526 Personen umfassenden Stammbaums durch Roushdy-Hammady et al. zeigte auf, dass die Mesotheliome dieser Dorfbewohner genetisch autosomal-dominant vererbt wurden [14]. Die Inzidenz an einem malignen Mesotheliom zu versterben ist in Immigranten aus diesen Dörfern, die in Schweden und Deutschland leben, ähnlich hoch oder teilweise höher, als in den beiden türkischen Heimatdörfern. Dies deutet darauf hin, dass Erionit eigentlich als Cofaktor ähnlich dem SV40 zur Entstehung eines Mesothelioms in genetisch prädispositionierten Menschen beiträgt. Gestützt wird diese Theorie auch durch Daten, die belegen, dass in den benachbarten Dörfern, deren Häuser vergleichbare Mengen an Erionit aufweisen, keine erhöhten Mesotheliomraten vorkommen.

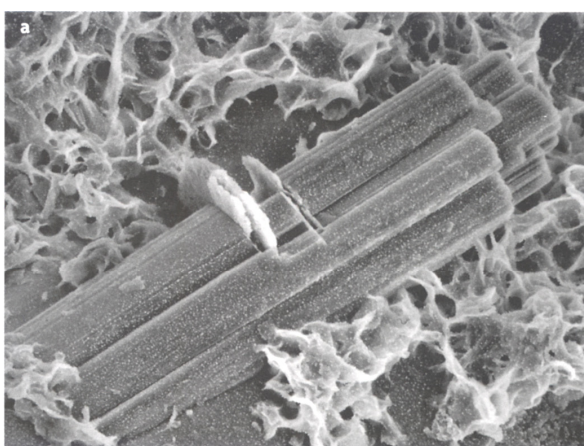


Figure 1 | Erionite and the village of Karain. a | A scanning electron microscope image of erionite is shown. Note the individual fibrils (0.5  $\mu\text{m}$  in diameter) forming the erionite bundles (5  $\mu\text{m}$  in diameter). b | The village of Karain is shown, where the houses are built with carved blocks of stone quarried from the erionite-containing rock from the nearby mountain and river.

**Abbildung 5. Erionit und das Dorf Karain in der Region Cappadocia [15].**

---

#### **1.2.4 Screening**

Derzeit gibt es noch Standardverfahren für die Früherkennung eines Mesothelioms in Personen, die einer Asbestexposition ausgesetzt waren. Durch das frühzeitige Erkennen würden sich für die Betroffenen bessere Überlebenschancen ergeben.

Im Serum von Asbest-expositionierten Patienten konnten erhöhte Werte für Osteopontin und das Soluble Mesothelin-related Protein (SMRP) nachgewiesen werden. Der SMRP-Wert war bei den Betroffenen um rund 75% höher als in der Kontrollgruppe [16]. Aufgrund dessen wurde SMRP als der neue Marker für die Früherkennung im Mesotheliom-Screening empfohlen und der „MESOMARK-Assay“ entwickelt. Mittels diesem Test, kann das von den Mesotheliomzellen sezernierte SMRP im Serum nachgewiesen werden [17]. Jedoch in einer ersten großen prospektiven Studie wurden 538 asbestexponierte Personen auf SMRP getestet. In dieser Studie wurde eine hohe Rate an falsch-positiven Ergebnissen festgestellt. Basierend auf diesen Ergebnissen kamen die Autoren zum Schluss, dass SMRP vorerst in der Früherkennung beim Mesotheliom eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint [18].□

### **1.3 Pathomechanismen**

Der exakte Mechanismus wie Asbestfasern MPM induzieren ist noch nicht geklärt. Die extrem lange Latenzzeit (15-40 Jahre) deutet aber darauf hin, dass es wahrscheinlich in dieser Zeit zu einer Akkumulierung genetischer Veränderungen kommt. Als weitere Mechanismen zu nennen sind die Generierung toxischer Sauerstoff- und Stickstoffradikale sowie die Aktivierung von Signalpathways in den Mesothelialzellen. Asbest hat möglicherweise eine Doppelrolle einerseits als Initiator (genetisch) und auf

---

der anderen Seite als Promotor (epigenetisch) in der Entwicklung des MPM einzugreifen [19].

### **1.3.1 Chromosomale Aberrationen im MPM**

Schäden an der DNA entstehen einerseits wenn die Asbestfasern direkt mit den Chromosomen der Zellen interagieren und andererseits indirekt durch die Generierung von Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species, ROS) und Stickstoffradikalen (reactive nitrogen species, RNS).

Es kommt zu Störungen der mitotischen Abläufe, als deren Konsequenz abnormale Karyotypen, mit extensiven Aneuploidien und strukturellen Rearrangements der Chromosomen hervorgehen [19]. Obwohl es für das MPM keine wirklich typischen Chromosomenanomalien bekannt sind. Gibt es aber eine Häufung wiederkehrender Anomalien, darunter Monosomien für das Chromosom 4 und hauptsächlich für Chromosom 22, weiters Polysomien für die Chromosomen 5, 7 und 20, sowie Verluste auf 1p21-p22, 3p21, 6q15-21, 9p21-p22 und 22q12.

Deletionen auf dem Chromosom 9p13-p22 konnten in 50% der MPM Fälle nachgewiesen werden. Die drei Tumorsuppressorgene, p14, p15, und p16, sind in dieser Region lokalisiert.

Der Verlust oder eine Veränderung dieser Tumorsuppressorproteine kann Einfluss auf die Transformation und Proliferation der Zellen nehmen. In Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, dass die Proteine p14 und p16, wenn sie in die Mesotheliom Zelllinien eingebracht werden einen Zellzyklusarrest initiieren [20]. Diese Ergebnisse deuten

---

darauf hin, das p14, p15 und p16 wichtige Targets für die Entwicklung dieses Tumors darstellen.

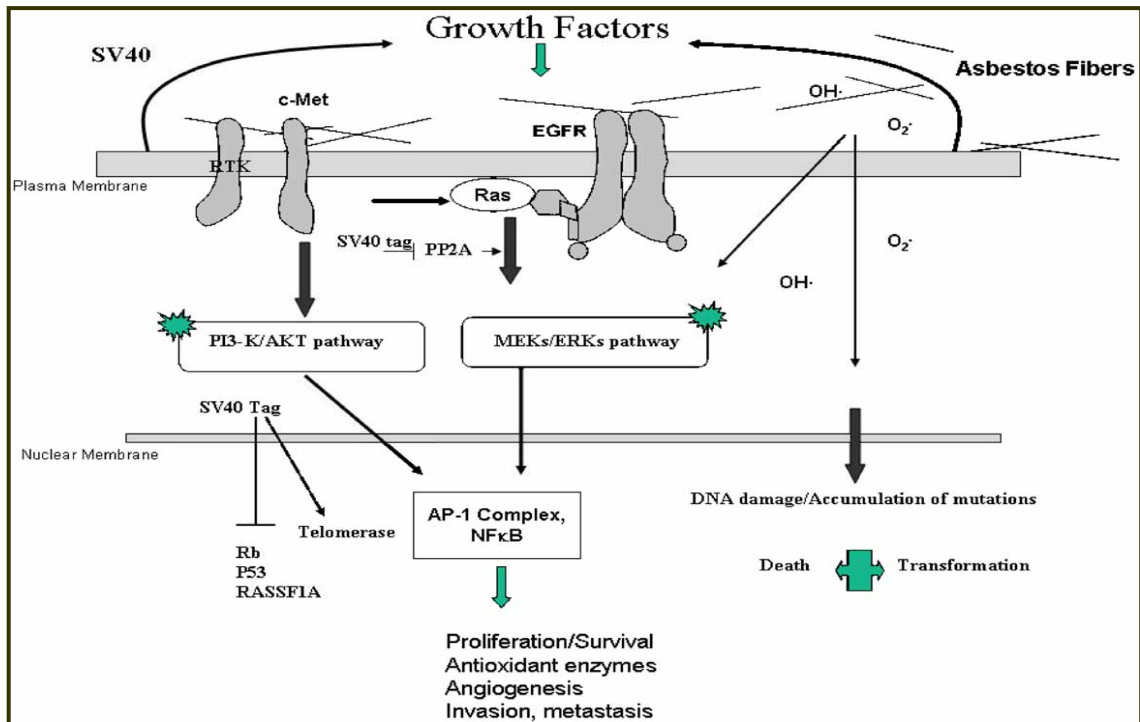
### **1.3.2 Signaling Pathways**

Die Fähigkeit von Zellen, auf externe Signale (Liganden z. B. Wachstumsfaktoren) mittels geeigneter Rezeptoren reagieren zu können, ist für die intra- und interzelluläre Kommunikation von entscheidender Bedeutung. Dadurch werden Signaltransduktionskaskaden sogenannte Signaling Pathways in Gang gesetzt, die zur Beeinflussung von Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Mitogenese, Zellmotilität, Regulation von Zellzyklusproteinen oder Freisetzung von Wachstumsfaktoren führen.

Asbest verursacht in der Zelle neben der genetischen Disposition auch eine Aktivierung dieser Signaling Pathways, die nicht nur eine Upregulation des Zell-Survivals zu Folge haben, sondern auch Proteine (Rezeptoren) aktivieren, welche Resistenzen gegenüber Apoptose und Chemotherapien favorisieren. Zahlreiche Studien haben das Vorkommen und den Einfluss dieser Signaling Pathways in MPM bestätigt [21, 22].

In Abb.6 sind die Signaling Pathways, die durch Asbest aktiviert werden schematisch dargestellt. Zu den bevorzugten Targets der Asbestfasern gehören:

- **der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)**
- **die Phosphoinositol 3-kinase (PI3K/AKT)**
- **der Hepatocyte Growth Factor Receptor (C-MET, HGFR)**
- **der Platelet-derived Growth factor Receptor (PDGFR)**



**Abbildung 6. Signaling Pathways im MPM.** Schematische Darstellung der Pathway-Aktivierung durch Asbestfasern an der Zelloberfläche, die zur Bildung von Wachstumsfaktoren und zur Initialisierung der Survivalmechanismen beitragen [19].

### 1.3.2.1 EGFR Pathway

Der EGFR Pathway gehört zu den am besten charakterisierten Signalwegen in den Mesotheliomen. Die Asbestfasern führen an der Zelloberfläche zur Aggregation einzelner EGFR Moleküle. Die dadurch gebildeten EGFR-Aggregate (die bevorzugte Form stellen Dimere dar) können mittels Phosphorylierung am EGFR die Selbstaktivierung, durch die verstärkte Proteinexpression von EGFR selbst sowie des Liganden EGF aufrechterhalten.

EGFR führt downstream zur Aktivierung weiterer Signalkaskaden wie der Mitogen-Activating Protein Kinase (MAPK) und der Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK 1/2). Während über die MAPK-Kaskade die Protooncogene c-Fos und c-Jun

---

vermehrt exprimiert werden, wird über ERK 1/2 vermehrt Fra-1 (Fos-related antigen 1) exprimiert wird. c-Fos und c-Jun bilden gemeinsam den Transkriptionsfaktor AP-1. Die Zelle braucht den Transkriptionsfaktor AP-1 für die Transition der G1-Phase und den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus. Fra-1 kann die Position von c-Fos einnehmen und bildet mit c-Jun gemeinsam den AP-1 Komplex.

### **1.3.2.2 PI3K/AKT, C-MET, und PDGFR Pathway**

Der PI3K/AKT Pathway spielt neben dem malignen Mesotheliom auch eine große Rolle in vielen anderen humanen Tumoren. Die PI3K/AKT Aktivierung unterstützt anti-apoptotische Mechanismen, fördert die Expression des NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktors, moduliert die Angiogenese, verstärkt die Telomeraseaktivität und verstärkt dadurch auch die Tumordinvasion. Beim Mesotheliom konnte durch Inhibition des PI3K/AKT Pathways gezeigt werden, dass dadurch auch Zellwachstum inhibiert und die Sensitivität auf konventionelle Chemotherapien erhöht wurde.

Dies gilt auch für den PDGFR-Pathway. Obwohl normale Mesothelzellen beide Rezeptorformen, den PDGFR- $\alpha$  und den PDGFR- $\beta$  exprimieren, wird bei den Mesotheliomen oft nur der PDGFR- $\alpha$  exprimiert. Es ist noch nicht geklärt, warum bei den Mesotheliomen bevorzugt der  $\alpha$ -Rezeptor synthetisiert wird. Es gibt Hinweise, dass der  $\alpha$ -Rezeptor an einem autokrinen Loop beteiligt ist, der in weiterer Folge für das Wachstum der Mesotheliome von Vorteil ist.

---

### **1.3.2.3 Einfluss der Wachstumsfaktoren**

In Studien konnte der Einfluss autokriner Wachstumsfaktoren, wie der Platelet-Growth Faktor (PDGF), Transforming Growth Faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2) und EGF Faktor in den Mesotheliomen nachgewiesen werden. Obwohl die Ergebnisse daraus im Moment zum Teil noch in Widerspruch stehen. Neben den erwähnten Wachstumsfaktoren sind noch weitere Faktoren und Zytokine bekannt, die in großen Mengen in den Mesotheliomzellen produziert werden. Dazu gehören TGF- $\alpha$ , Insulin-derived Growth Faktor-1 (IGF-1), Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , Granulocyte und Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factors (G-CSF, GM-CSF), Monocyte Chemotactic Protein (MCP-1), Leukocyte Inhibiting Factor (LIF), Tumour Necrosis Faktor- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 [23].

---

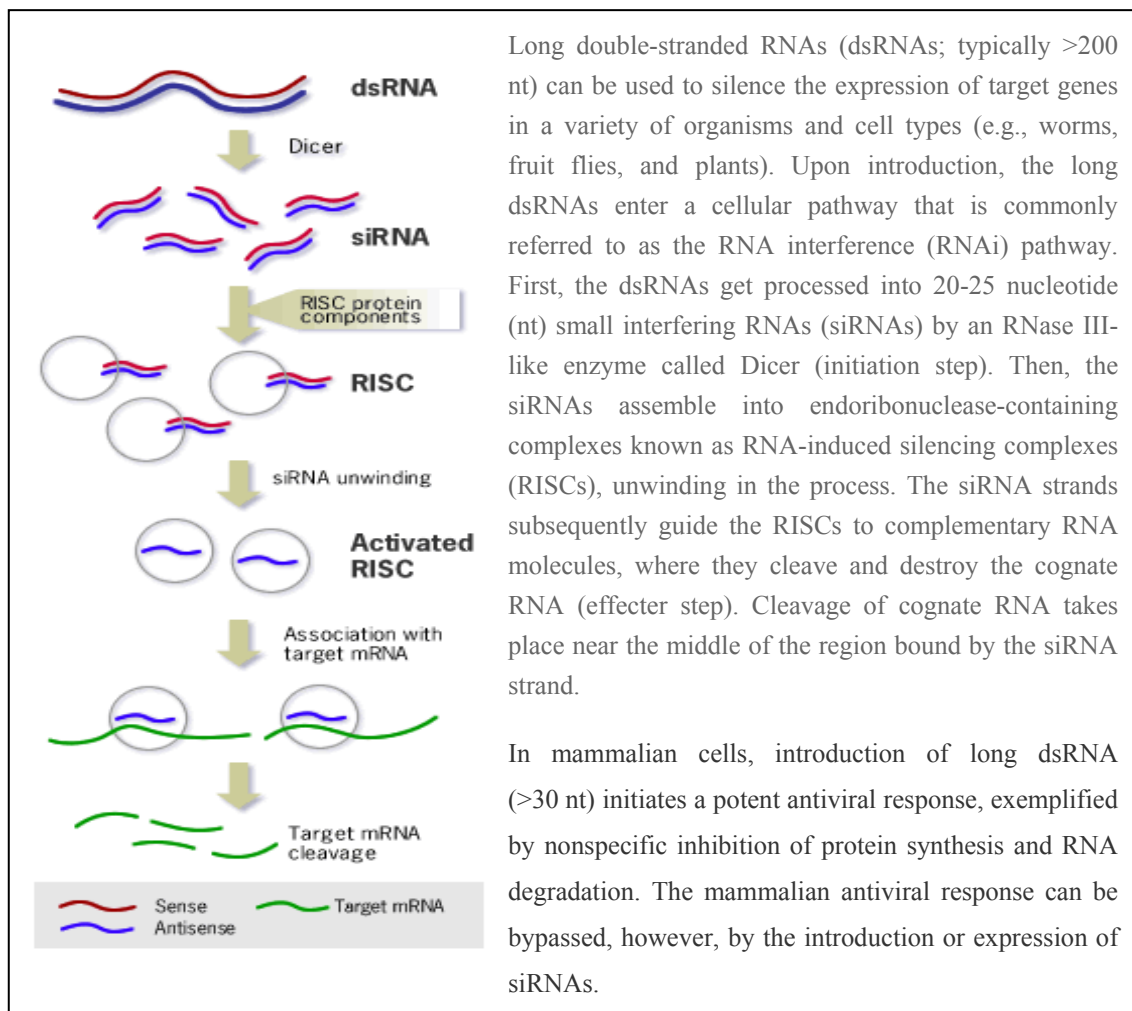
## 1.4 Mechanismus der RNA-Interferenz

Die RNA Interferenz ist ein hochkonservierter in einem breiten Spektrum an Organismen bestehender Mechanismus, bei dem es zur sequenz-spezifischen post-transkriptionalen Inhibition der Genexpression (Gene Silencing) kommt. Entdeckt wurde der Mechanismus der RNAi 1998, als Andrew Fire und Craig Mello dsRNA in den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* injizierten und dadurch eine Degradation der mRNA im Zytoplasma entdeckten, aber nur jener mRNA, die Sequenzhomologien zur dsRNA aufwies, die sie injizierten. Die RNAi hat auf diesem Wege auch entscheidend zur Entschlüsselung und zum Verständnis der Genfunktionen im *C. elegans* beigetragen [24].

In Säugerzellen war der Einsatz von RNAi zunächst nicht effektiv, da nach der Einbringung von dsRNA Molekülen die länger als 30bp waren ein antiviraler/Interferon Pathway ausgelöst wurde, der zu einer globalen Blockierung der Proteinsynthese und letztlich zum Zelltod führte [25]. Im Zytoplasma entstehen die small inhibitory RNAs (siRNAs) durch enzymatische Prozessierung längerer dsRNA durch den Dicer (eine ATP-abhängige Ribonuklease). Die degenerierten ds siRNA-Fragmente, mit einer Länge von 21-23bp und einem 2bp Überhang am 3'Ende, werden anschließend in einem Proteinkomplex RISC (RNA-induced silencing complex) eingebaut. Mithilfe der inkorporierten RNA-Fragmente bindet der RISC komplementär an die Ziel-mRNA. Die mRNA wird in weiterer Folge durch eine zum RISC gehörende Nuklease abgebaut und die Translation des betreffenden Proteins wird dadurch unterbunden.

### 1.4.1 siRNA

In der molekularbiologische Forschung werden synthetisch hergestellte siRNAs mit einer Länge von 21-22bp verwendet, um durch die RNA-Interferenz (RNAi) die Expression von bestimmten Zielgenen zu verringern. Die Zellen werden dabei *in-vitro* mit der siRNA transfiziert und die mRNA des Zielgens wird in Folge abgebaut. Die daraus resultierende Verringerung der Genprodukte (Gen-Knockdown) ermöglicht es Hinweise auf die physiologische Bedeutung des betreffenden Zielgens zu erhalten.



**Abbildung 7. Mechanismus der RNAi.**

[http://www.ambion.com/techlib/append/RNAi\\_mechanism.html](http://www.ambion.com/techlib/append/RNAi_mechanism.html)

---

## 1.5 Ziel der Studie

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einerseits Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Schaltwegen (Signaling Pathways) der malignen pleuralen Mesotheliome (MPM) zwischen short-term survivors (STS, <36 Monaten) und long-term survivors (LTS, >36 Monaten) zu analysieren, und andererseits Zielproteine (sog. Targets) für neue Therapieansätze innerhalb dieser Pathways zu definieren. Davon ausgehend sollte dann aufgrund der Datenlage ein Targetprotein ausgewählt werden. PCNA (proliferating cell nuclear antigen) wurde als Target für die weiterführenden Experimente in der Zellkultur ausgewählt. PCNA deshalb, weil es in den STS und auch in den LTS sehr hoch exprimiert wird, und somit in beiden Gruppen eine zentrale Rolle einnimmt.

In den anschließenden Experimenten in der Zellkultur wurde dann versucht die PCNA Synthese mittels RNA-Interferenz zu inhibieren. Der Nachweis einer effektiven Inhibition (Knockdowns) erfolgte auf Proteinebene mittels Western Blot und auf RNA-Ebene mittels Genexpressions Microarrays. Die Genexpressions Analyse wurden deshalb herangezogen, um einerseits den Knockdown auf RNA Ebene zu überprüfen und andererseits den globalen Effekt dieses Knockdown auf das restliche Transkriptom zu prüfen.

Die Arbeiten gliedern sich in die folgenden Bereiche:

Untersuchungen am Gewebe mittels Tissuemicroarray und Immunhistochemie um:

- (1) Unterschiede und Gemeinsamkeiten in den STS and LTS zu identifizieren
- (2) Definition charakteristischer Pathways für STS und LTS
- (3) Target-Selektion

---

*In-vitro* und molekularbiologische Untersuchungen umfassen

- (4) Mesothelioma-Zelllinien: Proteinexpression von PCNA
- (5) RNA-Interferenz: PCNA knockdown
- (6) Western Blot
- (7) Genexpressionsanalyse: Agilent Microarray.

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material Lösungen und Reagenzien allgemein

Die Bestandteile der häufig verwendeten Lösungen und Puffer wurden von Merck, Serva, Fluka und Sigma-Aldrich bezogen. Die benötigten Medien und Reagenzien für die Zellkultur sind im Methodenteil angeführt.

#### 2.1.1 Tissue-Microarray

**Tabelle 1. Antikörperliste.** Die verwendeten Antikörper und deren Applikation am TMA. Die 37 Antikörper sind in alphabetischer Reihenfolge gelistet mit Angabe über Verdünnung Antigenretrival, Detektionsverfahren und Hersteller. Die Antikörper wurden entsprechend den Angaben der jeweiligen Hersteller verwendet und ausgetestet.

Antikörper	Hersteller	Bestellnr.	Verdünnung	Antigen retrival*	Detektion*
AMPK $\alpha$ 2	Santa Cruz	Sc-19129	1:200	MW, 9.0	CM DAB Str.AB/428
$\beta$ -Catenin	Dako	M3539	1:100	WB	LSAB AEC
CREB binding protein	Chemicon	MAB1133	1:100	KT, 6.0	CM AEC
c-Fos	Santa Cruz	Sc-253	1:200	MW, 9.0	CM DAB
c-Jun	Santa Cruz	Sc-1694	1:200	MW, 9.0	CM DAB
c-Met	Santa Cruz	Sc-161	1:100	Ventana	DAB
c-Myc	Chemicon	MAB8864	1:100	MW, Tris	CM AEC
Cyclin D1	Neomarker	RM-9104	1:25	MW, Prot K	DAB HRP Kit
EGFR1	Dako	K1494	Dako Kit	Dako Kit	Dako Kit
ERK2	Santa Cruz	Sc-1647	1:200	Ventana CC1	Ventana iViewDAB

<b>Gab1</b>	Santa Cruz	Sc-9049	1:200	MW, 6.0	Env DAB
<b>Grb2</b>	Santa Cruz	Sc-255	1:50	Ventana CC1	Ventana iViewDAB
<b>GSK3</b>	Chemicon	AB9295	1:100	MW, 6.0	Env DAB
<b>IGF1R</b>	Neomarker	Ms-641	1:50	MW, EDTA 8.0	CM AEC
<b>IGF1R<math>\alpha</math></b>	Santa Cruz	Sc-7952	1:200	MW, 9.0	CM DAB
<b>JAK1</b>	Santa Cruz	Sc-7228	1:500	MW, 9.0	Env DAB
<b>MAP4K-1</b>	Abcam	Ab2646	1:200	WB40	ML AEC
<b>MECP2</b>	Santa Cruz	Sc-20700	1:50	MW, 6.0	CM DAB
<b>p-m-Tor (Ser2448)</b>	Cell Signaling	2971	1:40	MW, Tris 9.5 Urea	Env AEC
<b>NF<math>\kappa</math>B p65</b>	Santa Cruz	Sc-8008	1:2000	MW, 6.0	Dako HRP Kit
<b>p-AKT (Ser473)</b>	Cell Signaling	4051	1:100	MW, 9.0	CM AEC
<b>PCNA</b>	Dako	M0879	1:20	P	CM AEC
<b>p27Kip1</b>	Novocastra	NCL-p27	1:20	MW, 6.0	LSAB AEC
<b>PDGFR-<math>\alpha</math></b>	Neomarker	Rb-1691	1:50	KT, 6.0	CM AEC
<b>PDGFR-<math>\beta</math></b>	Neomarker	Rb-1692	1:100	MW, 9.0	Env AEC
<b>PI3K p110<math>\alpha</math></b>	Cell Signaling	4254	1:50	MW, 9.0	CM AEC
<b>p-ELK-1</b>	Santa Cruz	Sc-8404	1:50	MW, EDTA 8.0	CM DAB
<b>p-p70S6K (Ser411)</b>	Santa Cruz	Sc-8416	1:200	Ventana CC1	Ventana iViewDAB
<b>p-Paxillin</b>	Neomarker	MS404 P0	1:150	Ventana CC1	Ventana iViewDAB
<b>Src</b>	Cell Signaling	2108	1:50	Ventana CC1	Ventana iViewDAB
<b>STAT 1</b>	Santa Cruz	Sc-592	1:1000	Ventana	DAB
<b>STAT 3</b>	Santa Cruz	Sc-7179	1:100	Ventana	DAB
<b>STAT 5</b>	Santa Cruz	Sc-836	1:100	Ventana	DAB

<b>Survivin</b>	Neomarker	9245	1:200	MW, 6.0	Env DAB
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Cymbus	A75-2.1	1:150	MW, 6.0	CM DAB
<b>TIE2</b>	Santa Cruz	Sc-9026	1:50	Ventana CC1	Ventana CC1
<b>VEGF</b>	Santa Cruz	Sc-152	1:500	MW, 9.0	CM DAB

**\*Abkürzungen:**

CM= ChemoMate Dako; MW= Mikrowelle; KT= heat steamer; 6.0= citrate buffer ph 6.0;

Tris= TrisHCl + 5% Urea, pH9.5; P= Protease Tap XXIV, 0.1 % in PBS

WB 40= Wasserbad 40min, 90°C epitope retrieval solution; 9.0= target retrieval solution, pH 9.0, Dako

LSAB + AEC= LSAB Peroxidase Blocking Solution and AEC Substrate Chromogen, Dako

CM DAB= ChemoMate Detection Kit Peroxidase/ DAB rabbit/ mouse Chromogen

Env DAB= ChemoMate Dako Envision, HRP, rabbit/mouse.

---

### 2.1.2 RNA-Interferenz

Die entsprechenden siRNA-Sequenzen wurden von der Fa. Qiagen synthetisiert. In allen Fällen ist die Sequenz vom Sense- und Antisensestrang angegeben.

#### siRNA Duplexsequenzen für PCNA

GenBank Accession Number: NM\_002592.

**PCNA 1**      5'      CGAGGCCUGCUGGGAUUUdTdT3'  
                  3'dTdTGCUCCGGACGACCCUAUAA      5'

**PCNA 2**      5'      GAUGCCUUCUGGUGAAUUdTdT3'  
                  3'dTdTTCUACGGAAGACCACUUAAA      5'

**PCNA 3**      5'      AGCCACUCCACUCUCUUCAdTdT3'  
                  3'dTdTUCGGUGAGGUGAGAAAGU      5'

**PCNA 4**      5'      GCUGUUACCAUAGAGAUGAdTdT3'  
                  3'dTdTTCGACAAUGGUAUCUCUACU      5'

#### Positivkontrolle

siRNA Duplexsequenz für Lamin A/C GenBank Accession Number: NM\_002592

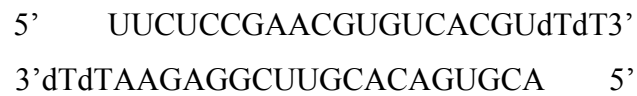
(Qiagen 1022050)

**Lamin A/C:** 5'      CUGGACUCCAGAAGAACAAdTdT3'  
                  3'dTdTGACCUGAAGGUCUUCUUGU      5'

---

### Negativkontrolle

Non-Silencing control siRNA (Qiagen 1022076):



### Effizienzkontrolle

Rhodamin Non-Silencing siRNA (Qiagen 1022083):



Die siRNAs wurden entsprechend dem Hersteller (Qiagen) in siRNA Suspensionspuffer gelöst, für 1min bei 90°C denaturiert und für weitere 60min bei 37°C inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert. Die Endkonzentration der siRNAs betrug 20µM.

## 2.1.3 Lösungen für die eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

**Acrylamidstammlösung 37,5:1:** # 10681, Serva

**Trenngelstammlösung:**            1,5        M     Tris  
    0,4        %     SDS  
    in Aqua bidest lösen und pH auf 6,8 stellen

**Sammelgelstammlösung:**        0,5        M     Tris  
    0,4        %     SDS  
    in Aqua bidest lösen und pH auf 8,8 stellen

---

<b>Trenngel (12 %):</b>	6,4	ml	Acrylamidstammlösung
	4,0	ml	Trenngelstammlösung
	5,6	ml	Aqua bidest
	20	µl	TEMED
	50	µl	APS (10 %)
<b>Trenngel (15 %):</b>	8,0	ml	Acrylamidstammlösung (30 %)
	4,0	ml	Trenngelstammlösung
	4,0	ml	Aqua bidest
	20,0	µl	TEMED
	50,0	µl	APS (10 %)
<b>Sammelgel (10%):</b>	1,5	ml	Acrylamidstammlösung (30 %)
	2,5	ml	Sammelgelstammlösung
	6,0	ml	Aqua bidest
	15,0	µl	TEMED
	20,0	µl	APS (10 %)
<b>Probenpuffer:</b>	10	mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,4)
	5	%	SDS
	10	%	2-Mercaptoethanol
	10	%	Glycerol

Die Lagerung der Lösungen erfolgte bei 4°C.

<b>Laufpuffer:</b>	15	g	Tris
	72	g	Glycin
	5	g	SDS
(getrennt in 100ml Aqua bidest lösen)			
auf 5l Aqua bidest auffüllen			

---

<b>Färbestammlösung:</b>	10	g	Phosphorsäure (85 %; einwiegen)
	400	ml	Aqua bidest
	50	g	Ammoniumsulfat
	490	ml	Aqua bidest
	10	ml	Commassie Brilliant BlueG-250- Stammlösung (5% in Aqua bidest)

Reihenfolge der Reagenzien beachten

**Proteinfärbelösung:** 20 ml Färbestammlösung  
(für ein Gel 16x14 cm) auf 100ml Methanol auffüllen

**Entfärbelösung:** 30 ml Methanol  
(für ein Gel) auf 100ml Aqua bidest auffüllen

#### Lösung für das Trocknen der SDS-Gele

**4 % Glycerinlösung:** 40 g Glycerin ( 97 %)  
auf 1000ml mit Aqua bidest auffüllen

#### 2.1.4 Lösungen für den Elektrotransfer der Proteine auf die PVDF Membran

**Transferpufferstammlösung:** 30 g Tris  
**10x** 143 g Glycin  
auf 1000ml mit Aqua bidest auffüllen

**1xTransferpuffer:** 100 ml Transferpufferstammlösung  
200 ml Methanol  
auf 1000ml mit Aqua bidest auffüllen



---

## 2.2 Methoden

### Grundlegende molekularbiologische Arbeitsmethoden

In diesem Kapitel soll nur kurz auf jene Methoden, die heute bereits als Standardmethode in molekularbiologischen Labors etabliert sind, eingegangen werden. Wenn nicht anders beschrieben, wurde entsprechend den Vorschriften von Ausubel et al. [26] oder Sambrook et al. vorgegangen [27].

#### 2.2.1 Tissue-Microarray (TMA)

##### 2.2.1.1.1 TMA Konstruktion

Für den Tissue-Microarray (TMA) wurden 48/70 bestätigte epitheloide MPM Fälle (aus USA, UK, Türkei, Italien, Frankreich und Österreich) mit ausreichendem FFPE Gewebe sowie klinischen Daten ausgewählt (Prof. Helmut H. Popper). Eine Asbestexposition konnte in einem Drittel der Patienten bestätigt werden. Als Grenzwert für das Überleben wurde eine Überlebenszeit von 36 Monaten gewählt: 26 Patienten mit einem Überleben >36 Monate wurden in die long-term Survivor (LTS) Gruppe, während 22 Patienten mit einem überleben <36 Monate in die short-term Survivor (STS) Gruppe. Die Überlebenszeit errechnet sich vom Zeitpunkt der Diagnose bis zum letzten Follow-up oder Tod.

Von jedem Gewebestück wurde ein H&E-Schnitt angefertigt. Dieser H&E-Schnitt dient als Referenzschnitt, auf welchen fünf repräsentative Tumoreale markiert wurden. Ausgehend von diesen Arealen wurden 3-5 Gewebezylinder (Durchmesser von 0,6 mm) mit einem manuellen Array-Instrument (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI) aus dem Gewebestück (Donorblock) ausgestanzt und in einen Paraffinblock (Rezipientenblock) überführt. Der fertige TMA enthält somit 243 Gewebestücken, wovon 13 Stenzen aus dem angrenzenden Parenchym stammen.

---

### **2.2.1.2 Immunhistochemische Untersuchungen (IHC)**

Vom TMA wurden 5- $\mu$ m Schnitte angefertigt und für die immunhistochemische Färbung mit den 37 Antikörpern nach Standardmethode, Institut für Pathologie Graz, vorbereitet. Die Antikörper wurden entsprechend den Vorgaben der Hersteller verwendet. Aus Gründen der besseren Lesbarkeit sind die 37 Antikörper in abgekürzter Schreibweise angegeben und in Tab.1 zusammengefasst dargestellt, mit Angaben zum Hersteller, Verdünnung, Antigenretrieval und Detektion.

### **2.2.1.3 Scoring**

Die IHC Analyse wurde semiquantitativ von Prof. Helmut H. Popper durchgeführt. Die Proteinexpression wurde für jede Gewebestanze nach der Färbeintensität (0: keine Färbung, 1+: schwach, 2+: moderat, 3+: stark) und mit dem Prozentsatz an positiven Zellen (0-100%), die das Protein exprimieren, beurteilt. Der Produkt-Score errechnet sich somit aus der Multiplikation vom Prozentsatz an positiven Zellen und der Färbeintensität. Der Produktscore (0-300) wurde für die statistische Analyse herangezogen.

### **2.2.1.3 Statistische Auswertung**

Die Nullhypothese, es besteht kein Unterschied in den Immunhistochemischen Parametern zwischen der LTS und der STS Gruppe, wurde mit dem Goeman's Globaltest R-package 3.0.2 simulierten Permutationstest-Kriterium generiert (<http://www.bioconductor.org/repository/release1.5/package/html/globaltest.html>). Die einzelnen immunhistochemischen Parameter wurden auf ihre Unterschiede mit dem Wilcoxon Rank Summen Test getestet. Die Korrelations-Koeffizienten wurden mit dem Spearman Koeffizienten vom Produkt-Score errechnet. Die Differenzen zwischen Korrelations- Koeffizienten in den LTS und STS basieren auf Differenzen zwischen den z-transformierten Spearman Korrelations-Koeffizienten Tests.

---

Die statistisch relevanten Korrelationen und Differenzen zwischen den Korrelationen wurden als Netzwerk graphisch mit einer Visualisierungs-Software dargestellt (Graphviz graph <http://www.graphviz.org>) mit Antikörpern als Knoten und Korrelationen als Verbindung zwischen den einzelnen Knoten.

Die Absolutwerte der Korrelationen legen den Abstand zwischen den Knoten fest, während der der Neonato-Algorithmus die Knoten so platziert, dass die Energie des Systems minimiert wird.

P-Werte  $<0,5$  werden als statistisch signifikant erfasst. Alle Permutationstests bestehen aus 1000 Replikaten.

## **2.2.2 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.2.1 Allgemeines zur Kultivierung von humanen Zelllinien**

Kulturmedien für die Züchtung von Zellen sind nicht nur für tierische Zellen ein optimales Nährmedium, sondern auch Bakterien und Pilze. Die Mehrzahl dieser Mikroorganismen hat eine schnellere Wachstumsrate als die Zellen und können außerdem durch ihre toxischen Stoffwechselprodukte die kultivierten Zellen irreversibel schädigen. Daher umfasst der wichtigste Teil der Arbeitsvorbereitungen die Vermeidung von Kontaminationen, um das Wachstum von Zellen unter aseptischen Bedingungen zu gewährleisten.

Alle Apparate und Geräte müssen vollständig von Mikroorganismen gereinigt werden. Die Sterilisation der Laborgeräte (Flaschen, Bechergläser Pinzetten) erfolgt im Autoklaven (20 Minuten, 130°C, 2 bar). Eine Keimzahlreduktion wird auch die Aktivierung UV-Lampe der Laminar-Flow-Bank 20 Minuten vor Arbeitsbeginn erreicht. Labortische und Medienflaschen werden mit 70-prozentigem Alkohol gereinigt, wie auch Hände und Unterarme. Alle Substanzen die Verwendung finden sind im Handel erhältliche Sterilprodukte. Aufgrund dieser Vorkehrungen werden fast alle bekannten Mikroorganismen zerstört. Die Maßnahmen entsprechen den Good Laboratory Practice Richtlinien der USA, der OECD und Japans [28].

### 2.2.2.2 Kultivierung der humanen Mesotheliomzelllinien

Die humanen Mesotheliomzelllinien CRL-5915 und MSTO-211H wurden von der ATCC (American tissue culture collection; USA) und der DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Deutschland) gekauft und nach Vorschrift kultiviert, passagiert und kryokonserviert (Tab.2).

Zelllinie	Herkunft	Bezeichnung	Ursprung
CRL-5915	ATCC	NCI-H2052	1988: 65jähriger Kaukasier
MSTO-211H	DMSZ	AC390	1988: 62jähriger Kaukasier

**Tabelle 2. Humane Mesotheliomzelllinien.**

### 2.2.2.3 Kulturmedium

Für die aus einem Organismus isolierten Zellen muss unter *in-vitro* Bedingungen eine Umgebung geschaffen werden, die Proliferation, Wachstum, Differenzierung und die Ausübung typischer Zellfunktionen erlaubt. Aufgabe des Nährmediums ist die Zufuhr von Nährstoffen und für die Aufrechterhaltung der richtigen physikalischen Verhältnisse wie osmotischer Druck und pH-Wert. Die Bestandteile des Kulturmediums sind in Tab.3 zusammengefasst.

Konzentration	Bestandteile	Herkunft
Pulvermedium	RPMI-1640, 2mM Glutamin	Sigma
1,5g/l	Natrium-Bikarbonat	Sigma
1mM	Natrium-Pyruvat	Sigma
4,5g/l	Glukose	Sigma
10mM	HEPES*	Sigma
10%	FBS*	Sigma
1%	Penicillin Streptomycin*	Sigma

\*Zugabe zum Medium erfolgt erst vor der Verwendung

**Tabelle 3. Bestandteile und Konzentration des verwendeten Kulturmediums.**

---

Für optimales Wachstum der Zellkulturen ist die Zugabe von fetalen Rinderserum (FBS) wichtig. Seren liefern Hormone, Bindungsproteine und Anheftungsproteine, zahlreiche zur Synthese benötigte Aminosäuren, anorganische Salze, Spurenelemente sowie Puffer- ( $\text{NaHCO}_3$ ) und Neutralisationssysteme, z.B. Albumine und Immunglobuline. Seren können andererseits auch toxische Stoffe, bakterielle Toxine und unerwünschte Mikroorganismen wie Viren (einschließlich Bakteriophagen), Mykoplasmen, Bakterien und Pilze sowie Antikörper dagegen[29]. Um Kontaminationen mit Mikroorganismen vorzubeugen wurden dem Kulturmedium das Antibiotikum, Pencillin/Streptomycin zugesetzt.

Die Bestandteile des Kulturmediums wie in Tab.2 beschrieben, wurden in den angegebenen Konzentrationen in Aqua bidest gelöst, der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt und anschließend sterilfiltriert. Dem Medium (Lagerung bei  $4^\circ\text{C}$ ) wurde vor dem Gebrauch noch HEPES, FBS und Penicillin zugegeben.

#### **2.2.2.4 Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität**

Zur Bestimmung der Zellzahl (mittels der Bürcker-Türck-Zählkammer) und der Vitalität wurde ein Farbttest (Dye Exclusion Test) mit Trypanblau (Sigma) durchgeführt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion mit 4 Sulfonatgruppen leicht an Proteine bindet. Der Test beruht darauf, dass nur tote Zellen Trypanblau aufnehmen können, während bei lebenden Zellen das Zytoplasma und der Kern nicht gefärbt wird. Die Zählung sollte nach 10 Minuten abgeschlossen sein, da Trypanblau zytotoxisch wirkt.

#### **Formel für die Berechnung der Zellzahl/ml:**

$$\frac{\text{Anzahl vitaler Zellen}}{\text{Anzahl der Großquadrate} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}} = \text{Zellzahl/ml}$$

---

### **Formel für die Berechnung der Zellvitalität:**

$$\frac{\text{Anzahl lebender Zellen} \times 100}{\text{Gesamtzellzahl}} = \% \text{ vitale Zellen}$$

#### **2.2.3 siRNA-Transfektion**

Die Transfektion mit siRNAs wurde für jede verwendete Zelllinie hinsichtlich der Parameter Zelldichte, Art und Menge des Transfektionsreagenz und Arbeiten im serumfreien oder serumhaltigen Milieu optimiert. Zudem wurde die Konzentration des verwendeten und Transfektionmittels auf die niedrigstmögliche noch optimal wirksame Konzentration herabtitriert.

Die wurden die Transfektionen in 24-Well- oder 12-Well-Platten durchgeführt.

Für die Transfektion der Zelllinien CRL-5915 und MSTO-211H ergaben sich die folgende optimierten Transfektionsprotokolle:

##### **2.2.3.1 CRL-5915 Transfektion mit Lipofectamine 2000**

#### **siRNA Transfektion für CRL-5915**

Bei den CRL-5915 Zellen wurden die Passagen 29-35 verwendet.

Format: 12-well-plate

Medium (NM): RPMI-1640 (mit 10% FBS; ohne Antibiotikum) V=1ml NM

Zell-Aussaat: 3x 250.000 Zellen/well. Die Zellen wurden am Abend vor der Transfektion in 2ml NM/well kultiviert; 5h vor der Transfektion wurde das NM abgesaugt und durch 1ml NM ersetzt.

siRNA-Konzentration: siRNA stock solution 20µM (c=0,3µg/µl).

---

7µl siRNA/well wurde für die Transfektion eingesetzt.

Transfektionsreagenz: 5µl Lipofectamine™ 2000 eingesetzt (Invitrogen; Cat. No. 11668-027).

Die Negativkontrolle (Non-Silencing siRNA) und Rhodamine Non-Silencing siRNA wurden in Anlehnung an das Protokoll gleich behandelt.

Durchführung:

- pro well: 5µl Lipofectamine 2000 und 95µl Opti-MEM vorsichtig mischen, 5min bei Raumtemperatur inkubieren
- pro well: 7µl siRNA mit 93µl Opti-MEM vorsichtig mischen
- Lipofectamine 2000-Opti-MEM zum siRNA-Opti-MEM Ansatz hinzugeben, vorsichtig durch Pipettieren mischen, 20min bei Raumtemperatur inkubieren
- je 200µl der siRNA-Lipid-Komplexe tropfenweise zu den im Wachstumsmedium befindlichen Zellen hinzupipettieren, durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen der Platten untermischen
- für die unbehandelte Kontrolle 200µl Opti-MEM zu den Zellen geben.

Die Zellen täglich lichtmikroskopisch auf morphologische Veränderungen überprüfen und nach der Inkubationszeit von 48h für sekundäre Tests ernten.

Format: 24-well-plate

Medium (NM): RPMI-1640 (mit 10% FBS; ohne Antibiotikum) V=500 NM

Zell-Aussaat: 3x150.000 Zellen/well. Die Zellen wurden am Abend vor der Transfektion in 1ml NM/well kultiviert; 5h vor der Transfektion wurde das NM abgesaugt und durch 500µl NM ersetzt.

siRNA-Konzentration: siRNA stock solution 20µM (c=0,3µg/µl).

3,5µl siRNA/well eingesetzt.

---

Transfektionsreagenz: 2,5µl Lipofectamine™ 2000 eingesetzt (Invitrogen; Cat. No. 11668-027).

Die Negativkontrolle (Non-Silencing siRNA) und Rhodamine Non-Silencing siRNA wurden in Anlehnung an das Protokoll gleich behandelt.

#### Durchführung

- pro Well: 2,5µl Lipofectamine 2000 und 47,5µl Opti-MEM vorsichtig mischen, 5min bei Raumtemperatur inkubieren
- pro Well: 3,5µl siRNA mit 46,5µl Opti-MEM vorsichtig mischen
- Lipofectamine 2000-Opti-MEM zur siRNA-Opti-MEM hinzugeben, vorsichtig durch Pipettieren mischen, 20min bei Raumtemperatur inkubieren
- je 100µl der siRNA-Lipid-Komplexe tropfenweise zu den im Wachstumsmedium befindlichen Zellen hinzupipettieren, durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen der Platten untermischen
- für die unbehandelte Kontrolle 100µl Opti-MEM zu den Zellen geben

Die Zellen täglich lichtmikroskopisch auf morphologische Veränderungen überprüfen und nach der Inkubationszeit von 48h für sekundäre Tests ernten.

### **2.2.3.2 MSTO-211H Transfektion mit Lipofectamine 2000**

#### **siRNA Transfektion für MSTO-211H**

Bei den MSTO-211H Zellen wurden die Passagen 10-15 verwendet.

#### Format: 12-well-plate

Medium (NM): RPMI-1640 (mit 10% FBS; ohne Antibiotikum) V=1ml NM

Zell-Aussaat: 3x 200.000 Zellen/well. Die Zellen wurden 24 h vor der der Transfektion in 2ml NM/well kultiviert; 5h vor der Transfektion wurde das NM abgesaugt und durch 1ml NM ersetzt.

siRNA-Konzentration: siRNA stock solution 20µM (c=0,3µg/µl).

7µl siRNA/well wurden eingesetzt.

Transfektionsreagenz: 5µl Lipofectamine™ 2000 eingesetzt (Invitrogen; Cat. No. 11668-027).

---

Die Negativkontrolle (Non-Silencing siRNA) und Rhodamine Non-Silencing siRNA wurden in Anlehnung an das Protokoll gleich behandelt.

#### Durchführung

- pro Well: 5µl Lipofectamine 2000 und 95µl Opti-MEM vorsichtig mischen, 5min bei Raumtemperatur inkubieren
- pro Well: 7µl siRNA mit 93µl Opti-MEM vorsichtig durch Pipettieren mischen
- Lipofectamine 2000-Opti-MEM zur siRNA-Opti-MEM hinzugeben, vorsichtig durch Pipettieren mischen, 20min bei Raumtemperatur inkubieren
- je 200µl der siRNA-Lipid-Komplexe tropfenweise zu den im Wachstumsmedium befindlichen Zellen hinzupipettieren, durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen der Platten untermischen
- für die unbehandelte Kontrolle 200µl Opti-MEM zu den Zellen geben

Die Zellen täglich lichtmikroskopisch auf morphologische Veränderungen überprüfen und nach der Inkubationszeit von 48h für sekundäre Tests ernten.

#### Format: 24-well-plate

Medium (NM): RPMI-1640 (mit 10% FBS; ohne Antibiotikum) V=500 NM

Aussaat Zellen: 3x100.000 Zellen/well. Die Zellen wurden 24 h vor der der Transfektion in 1ml NM/well kultiviert; 5h vor der Transfektion wurde das NM abgesaugt und durch 500µl NM ersetzt).

siRNA-Konzentration: siRNA stock solution 20µM (c=0,3µg/µl).

4µl siRNA/well wurden eingesetzt.

Transfektionsreagenz: 3µl Lipofectamine™ 2000 eingesetzt (Invitrogen; Cat. No. 11668-027).

Die Negativkontrolle (Non-Silencing siRNA) und Rhodamine Non-Silencing siRNA wurden in Anlehnung an das Protokoll gleich behandelt.

---

### Durchführung:

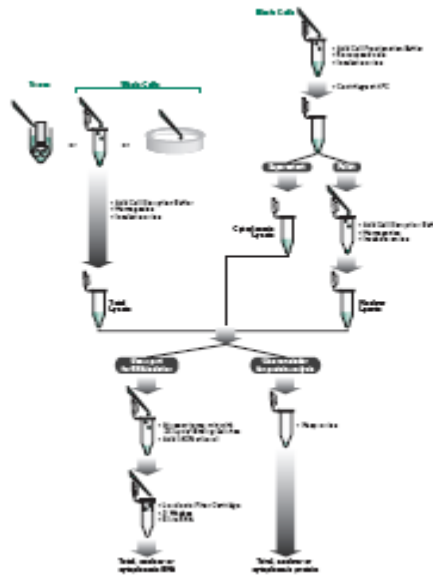
- pro Well: 3µl Lipofectamine 2000 und 47µl Opti-MEM vorsichtig mischen, 5min bei Raumtemperatur inkubieren
- pro Well: 4µl siRNA mit 46µl Opti-MEM vorsichtig durch Pipettieren mischen
- Lipofectamine 2000-Opti-MEM zur siRNA-Opti-MEM hinzugeben, vorsichtig durch Pipettieren mischen, 20min bei Raumtemperatur inkubieren
- je 100µl der siRNA-Lipid-Komplexe tropfenweise zu den im Wachstumsmedium befindlichen Zellen hinzupipettieren, durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen der Platten untermischen
- für die unbehandelte Kontrolle 100µl Opti-MEM zu den Zellen geben

Die Zellen täglich lichtmikroskopisch auf morphologische Veränderungen überprüfen und nach der Inkubationszeit für sekundäre Tests ernten.

## **2.2.4 RNA und Protein Extraktion aus siRNA transfizierten Zelllinien**

### **2.2.4.1 RNA und Protein Extraktion**

Zur Gewinnung der der RNA und Protein aus einer Probe wurden die Zellen ohne vorheriges trypsinieren direkt in der Zellkulturplatte lysiert und anschließend die RNA/Proteine extrahiert. Hierbei wurde das Medium abgesaugt, einmal mit PBS (pH 7,3) gewaschen und dann die Zellen mit eiskaltem Lysepuffer im well lysiert. Für die Extraktion von RNA und Protein wurde ein kommerzieller Kit herangezogen, und entsprechend des Herstellers vorgegangen. Mit dem Kit, Protein AND RNA Isolation System (PARIS™, Ambion 1921), konnte Total-RNA sowie Total-Protein aus dem gleichen Ansatz gewonnen werden. Zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen wurde die Arbeitsfläche und Pipetten mit RNase-Away™ Reagent (Invitrogen 10328-011) vorbehandelt, sowie RNase-freie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet. In Abb.8 ist die Extraktion mit PARIS™ graphisch dargestellt. Anschließend wurde die RNA- und Proteinkonzentration bestimmt und die Proben für die weitere Verwendung bei -80°C für RNA Proben und bei -20°C für Proteine gelagert.



**Abbildung 8. Die Extraktion der RNA und Proteine aus den Zelllysaten im Überblick (PARIS™ Handbuch, Ambion).**

Für die Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit der Probe wurde ein Aliquot (1:100) mit Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 nm ( $A_{260}$ ) und 280 nm ( $A_{280}$ ) am Photometer (Biorad) vermessen. Die Konzentration wurde nach folgender Formel errechnet:

$$c \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l} = (A_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} * 40 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml})/1000.$$

Die Reinheit der RNA wird durch die Ratio  $A_{260}/A_{280}$  angegeben. Dieser Wert sollte im Bereich 1,8 – 2,1 liegen.

#### 2.2.4.2 Bestimmung der RNA-Qualität

Für die Bestimmung der RNA Qualität am Bioanalyser 2100 (Agilent Technology) wurde max. 500 ng RNA eingesetzt. Für die Genexpressions-Experimente wurden nur RNA Proben mit Ratio 2,0 – 2,1, sowie einer RNA-Integrity-Number (RIN) 8-9 herangezogen.

---

### **RNA-Integrity-Number (RIN)**

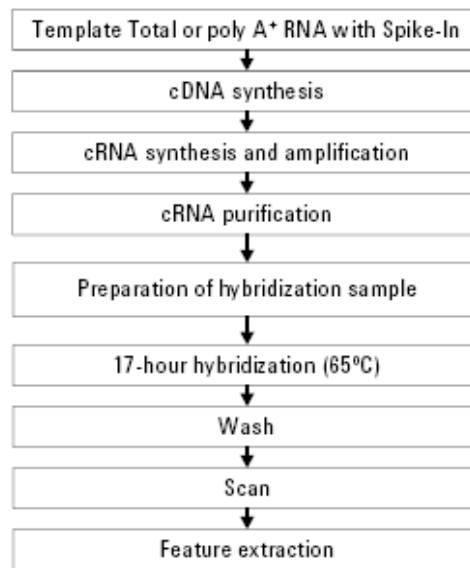
RIN steht für RNA-Integrity-Number und ist ein Qualitätskriterium für RNA-Proben, um innerhalb von Genexpressionsstudien eine gewisse Standardisierung zu erzielen. Die Einbeziehung der RIN in Genexpressions Analysen ist somit ein wichtiges Kriterium, um einerseits Studien miteinander vergleichbar zu machen, und andererseits auch eine gewisse Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Da die individuelle Interpretationen der RNA-Qualität mitunter auch sehr subjektiv sein kann.

Die RIN wird mittels einem speziellen Software Algorithmus (patentierter Algorithmus von Agilent Technology), dem das Verhältnis der eukaryontischen ribosomalen RNA 28S/18 (im vor liegenden Fall) zugrunde liegt errechnet, und zeichnet sich dadurch aus, dass die Absenz bzw. die Gegenwart von RNA-Degradationsprodukten berücksichtigt wird, und liegt im Bereich von RIN 1-10. Wobei RIN 1 für ein höchst degradiertes RNA-Profil steht, während RIN 10 für ein absolut intaktes RNA-Profil steht. RIN ist somit eine qualitative Bestimmung der RNA und unabhängig von der eigentlichen Konzentration [30].

#### **2.2.5 Genexpressions Analyse mit dem Human Whole Genome Array**

Der in dieser Arbeit verwendete human Whole Genome Array (Agilent) besteht pro Slide aus 4 Sub-Arrays mit je 44.375 Features (4 x 44 K) und deckt 41.000 Gene bzw. Transkripte des humanen Genoms bzw. Transkriptoms ab.

Für die durchgeführten Einfarben (One-colour)-Experimente wurden pro Array 500 ng Total-RNA eingesetzt. Abb. 9 zeigt den Workflow der durchgeführten Genexpressions Experimente mit dem Agilent Whole Genome Array, beginnend mit der RNA-Probe bis hin zur Datenanalyse.



**Abbildung 9. Workflow der durchgeführten Genexpressions Analyse mit dem Agilent Whole Genome Array.**

### 2.2.5.1 cDNA-Synthese

Für die Synthese der cDNA wurde 500ng Gesamt-RNA mit Hilfe des Low RNA Input Linear Amplification Kit (Agilent Technologies, 5185-5348) exakt nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben.

Die verwendete Spike-RNA (Agilent Technolgies, 5188-5977) wurde vor der Reaktion 1:10 verdünnt und ist ausreichend für Experimente im Bereich von 200 -500 ng.

Für die First-Strand Synthese wurde ein T7 Promotor-Primer verwendet, der auch für die anschließende in-vitro-Transkription durch die MMLV Reverse Transkriptase genutzt wird.

#### Ansatz cDNA-Synthese

Pro Ansatz: $V_{\text{total}} = 20\mu\text{l}$	Vol( $\mu\text{l}$ )
500 ng RNA in	5,3
T7 Promotor Primer	1,2
Spike RNA	5,0
auf	11,5

---

Zugabe Master Mix (11,5  $\mu$ ):

5x First stand buffer	4,0
0,1 M DTT	2,0
10 mM dNTP mix	1,0
MMLV-RT1.0	1,0
RNaseOUT	0,5

-Inkubation im Wasserbad bei 40°C für 2 h

-Enzymaktivierung der MMLV Reversen Transkriptase bei 65°C für 15 min

-sofort auf Eis für 5 min, spin down.

Die cDNA kann anschließend sofort markiert werden wie unter 2.2.5b beschrieben, oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

### **2.2.5.2      Synthese der Fluoreszenz-markierten cRNA**

Die Synthese der fluoreszenz-markierten cRNA erfolgte durch den Einbau von Cyanine 3 - markierten CTP Nukleotiden (Cy3-CTP 10 mM, Perkin Elmer NEL 580) während der cRNA Synthese. Hierbei werden neben der Verwendung unmarkierter Ribonukleotide auch Cy3-markierte Ribonukleotide (CTP) verwendet, das nach der Hybridisierung am Array detektiert wird.

Die Konzentration der Cy3-CTP (stock 10 mM) war so gewählt, daß die Endkonzentration im Ansatz bei 300  $\mu$ M lag, d.h. das statistisch jedes 50. Nukleotid ein Cy3-markiertes NTP und somit je 100 mer, zwei Cy3-CTP Moleküle in die cRNA eingebaut werden.

#### **Die Konzentration der einzelnen Nukleotide im Mix:**

A, U, G	je 25 mM
C	7, 5 mM
Cy3-CTP	10 mM

---

Die cDNA wird mit 2,4 µl Cy3-CTP (10 mM) vor Zugabe des Master-Mix versetzt (lichtgeschützt arbeiten).

**Master Mix cRNA Ansatz, Angaben pro Ansatz:**

<u>V<sub>µl</sub> = 57,6 µl</u>	<u>Vol (µl)</u>
Nuclease-free water	15,3
4xTranskriptionspuffer	20,0
0,1 M DTT	6,0
NTP-Mix	8,0
50% PEG	6,4
RNaseOUT	0,5
Anorganische Pyrophosphatase	0,6
T/ RNA Polymerase	0,8
Zugabe Master Mix	57,6 µl

Inkubation bei 40°C im Wasserbad (lichtgeschützt) für 2 Stunden.

**2.2.5.3 cRNA Aufreinigung und Quantifizierung**

Die Aufreinigung der amplifizierten cRNA erfolgte mit dem RNeasy purification Kit (Qiagen 74104). Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C und 11.000 x g durchgeführt.

Durchführung

- cRNA-Ansatz: Zugabe von 20 µl Wasser (nuklease-frei!), das Endvolumen sollte bei 100 µl liegen
- 350 µl RLT-Puffer zugeben, mischen
- 250 µl Ethanol abs. zugeben, mischen

- 
- Probe auf RNeasy Säulchen aufbringen
  - Zentrifugieren: für 30 sec, das Zentrifugat verwerfen u. Säulchen in ein neues Röhrchen überführen.
  - 500 µl RPE Puffer auf das Säulchen geben
  - Zentrifugieren: für 30 sec, das Zentrifugat verwerfen.
  - 500 µl RPE Puffer auf das Säulchen geben, zentrifugieren für 60 sec, Säulchen in eines neues Röhrchen überführen.
  - Eluieren der cRNA durch die Zugabe von 30 µl nuclease-freien Wasser, inkubieren für 60 sec bei RT und anschließender Zentrifugation für 30 sec.

Gereinigte cRNA wurde bis zur Quantifizierung und Fragmentierung auf Eis gelagert (lichtgeschützt), die verbleibende cRNA wurde bei -80°C gelagert.

Die Bestimmung der cRNA-Konzentration und Messung der spezifischen Aktivität wurde mit dem NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spektrophotometer durchgeführt.

Die spezifische Aktivität errechnet sich wie folgt:

$$\text{(Cy3 pmol/}\mu\text{l)} / \text{(cRNA ng/}\mu\text{l)} * 1000 = \text{pmol Cy3/}\mu\text{g cRNA}$$

Für die Hybridisierung wurden nur Proben herangezogen, die einen Wert > 8 pmol Cy3/µg cRNA aufwiesen. Für One-Colour Experimente, wie in dieser Arbeit, wurden pro Array

1,65 µg Cy3-gelabelte cRNA für die Hybridisierung eingesetzt.

---

#### 2.2.5.4 Fragmentierung der cRNA

Vor der Hybridisierung auf dem Array müssen die cRNA-Stränge in Fragmente von ca. 35-200 bp Länge zerlegt werden, um optimal an die Oligonukleotidsonden auf der Array-Oberfläche binden zu können.

**Fragmentationsansatz:**  $V_{\text{total}} = 55 \mu\text{l}$

Cy3 cRNA	1,65 $\mu\text{g}$
10X Blocking Agent	11
Nuclease-freies Wasser auf	52,8
25X Fragmentation Puffer	2,5

- Inkubation bei 60°C für exakt 30 min im Thermomixer
- Zugabe von 55 ml 2X Hybridisierungspuffer um die Fragmentation der cRNA zu stoppen
- Vorsichtig mischen, dabei Luftblasen vermeiden, kurz abzentrifugieren

Probe bis zur Hybridisierung auf dem Array auf Eis halten (maximal bis zu 1 Stunde!).

#### 2.2.5.5 Hybridisierung auf dem Human Whole Genome Microarray Slides

(4 x 44 K Format: 4 Arrays per Slide)

Der Hybridisierungsansatz wurde in speziellen Hybridisierungskammern (Agilent Hybridisation chamber Kit G2534A) im Hybridisierungsofen bei 65°C für 17 Stunden und 10 rpm durchgeführt.

100  $\mu\text{l}$  des Hybridisierungsmixes wurden für einen Array eingesetzt. Die Hybridisierungskammern wurden entsprechend des Herstellers zusammengesetzt.

#### 2.2.5.5 Waschen und Stabilisieren der Slides

Das Waschen der Slides wurde gemäß Agilent Protokollen durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Waschschritt für die Stabilisierung und Trocknung der Microarray Slides eingebaut. Der Farbstoff Cyanine 3 ist sehr sensitive gegenüber Ozon, bei Werten ab 50 ppb (100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) kommt es Degradation von Cyanine 3 und in weiterer Folge zu

---

Signalreduktion. Um dem entgegenzuwirken, wurden die Slides mit der Stabilisation and Drying Solution behandelt.

**Die einzelnen Waschschritte in der Übersicht:**

	<b>Wasch-Puffer</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
1. Waschschritt	GE Wash Buffer 1	RT	1 min
2. Waschschritt	GE Wash Buffer 2	37°C	1 min
Acetonitril	Acetonitril	RT	1 min
3. Waschschritt	Stabilisation and Drying Solution	RT	30 sec

**2.2.5.7 Signaldetektion**

Die Signale der Slides wurden nach dem Waschen sofort vermessen. Die Slides wurden dazu am Agilent Microarray Scanner (G2565 BA) eingescannt.

**Einstellungen am Microarray Scanner:**

Scan Region	61 x 21,6 mm (4 x 44 K Format)
Scan Auflösung	5 µm
PMT im dualen Modus	High density 100 % PMT
(Extended Dynamic Range)	Low density 10 % PMT

Durch den dualen Modus (High and Low density) wurden 2 Bilddateien (TIF, 16 bit Dateien) generiert, die anschließende Dateneextraktion erfolgte durch die Agilent Software Feature Extraction (FE) 9.1.3.1. Die Software generiert auch einen Qualitäts Report (QC Report) für jeden einzelnen Array. Der QC Report gibt Aufschluss über die Qualität der Hybridisierung. Die Daten die durch die FE Software generiert werden, dienen als Grundlage für die eigentliche Datenanalyse mit Genespring GX (Agilent).

---

## **2.2.6 Proteinanalytik der Proteinextrakte aus den siRNA transfizierten CRL-5915 und MSTO-211H Zelllinien**

Die Zellen wurden nach der siRNA Transfektion mit PBS gewaschen und die Zellysate wie unter Punkt 2.2.4.a RNA und Protein Extraktion beschrieben gewonnen.

### **2.2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Micro BCA Protein Assay Kits (Pierce 23235) ermittelt. Die Quantifizierung beruht auf der durch die Proteine vermittelte Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen in alkalischer Umgebung.  $\text{Cu}^{+}$  bildet mit dem Reagenz Bicinchonsäure (BCA) einen violett gefärbten Komplex, die Absorption photometrisch bei 562 nm gemessen.

Für die Erstellung der Standardkurve wurde der im Kit enthaltende BSA-Proteinstandard mit Aqua bidest wie folgt verdünnt: 200, 120, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 und 0  $\mu\text{g/ml}$ . Für die Leerwerte wurde Aqua bidest verwendet. Die Reaktion wurde gemäß dem Herstellerprotokoll in 96-Well-Mikrotiterplattten durchgeführt. Die Inkubation der Proben erfolgte für 60 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  und nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Absorption im Photometer bei 562 nm vermessen.

Von den Messwerten der Proben und Proteinstandards wurde die Absorption der Leerwerte abgezogen. Es wurde Standardkurve erstellt und aus dieser die Konznetration der Proteinextrakte errechnet. Die Proteinextrakte und der Proteinstandard wurden in Triplikaten

angesetzt, die Absorptionswerte gemittelt und durch Interpolation die Konzentration bestimmt.

---

### **2.2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einer Polyacrylamidgelmatrix durch Anlegen eines elektrischen Spannungsfeldes. Für die Auftrennung der Proteine nach der Methode Laemmli [31] wurde die Gelelektrophoreseapparatur von Peqlab Biotechnologie verwendet. Bei der Herstellung der 12 und 15 prozentigen Gele, sowie bei der Durchführung der Elektrophorese wurde entsprechend der Benutzervorschrift und nach Ausubel et al. [26] vorgegangen. Die Proteinproben wurden 1:1 mit reduzierendem Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 500 Volt, einer konstanten Stromstärke von 200 mA für eine Stunde. Als Protein-Molekulargewichtsmarker wurde der farbige Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, (#SM0671, Fermentas) verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in die Färbelösung gelegt und über Nacht am Schüttler gefärbt. Der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue-G-250 bildet dabei einen festen Komplex mit den Proteinen aus. Überschüssiger Farbstoff wurde mittels Entfärbelösung für 20 Minuten entfernt. Danach wurden die Gele 15 Minuten lang in eine 4 prozentige Glycerinlösung eingelegt und anschließend unter Vakuum im Geltdrockner (Slab Dryer, BioRad) getrocknet.

### **2.2.6.3 Western Blot: Elektrotransfer der Proteine nach dem Semidry-System**

Die Technik des Western Blottings dient der Detektion von Proteinen aus einem Proteingemisch mittels spezifischer Antikörper. Das Proteingemisch wird über die denaturierende SDS-PAGE aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Membran transferiert. Diese Membran wird mit dem primären Antikörper gegen das gesuchte Protein inkubiert. Der gebundene Antikörper wird mit einem Sekundärantikörper, der mit einer alkalischen Peroxidase gekoppelt ist, über seine enzymatische Sekundärreaktion detektiert.

---

### **Semidry-Transfer**

Die Proteine wurden nach der Auftrennung in einem 15 prozentigen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf eine Polyvinyliden-Difluorid Membran (PVDF)-Membran transferiert

(Hybond-PT<sup>TM</sup> Amersham, GE Healthcare).

Die trockene PVDF-Membran muß vor jeder Verwendung einem „prewetting“ unterzogen werden: PVDF-Membran für 10sec in Methanol und anschließend 5min in Aqua bidest waschen. Der Transfer wurde mit dem Semidry-System (PerfectBlue, Peqlab Biotechnologie) durchgeführt. Alle Transfer-Komponenten (6 Filterpapiere, 1 PVDF-Membran (prewetted), 1 Gel) wurden mit Transferpuffer (frisch hergestellt; 4°C) equilibriert und luftblasenfrei übereinandergeschichtet. Der Proteintransfer wurde für 1-1,5h Stunden bei einer Stromstärke von 1,2 -1,5mA/cm<sup>2</sup> Gel durchgeführt. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran mit Ponceau S-Färbelösung gefärbt und nach kurzem Spülen mit Aqua bidest, wurden die transferierten Proteine sichtbar gemacht. Anschließend wurde die Membran für 15 Minuten in TBS gespült und auf Filterpapier mit der Proteinseite nach oben getrocknet. Das Trocknen der Membran, vor der Inkubation mit dem primären Antikörper, ermöglichte eine sehr sensitive Detektion der Proteine.

#### **2.2.6.4 Antikörper Inkubation**

Die getrocknete PVDF-Membran wurde für 1 Stunde in TBS rehydriert und zur Blockierung unspezifischer Bindestellen für 3 Stunden in 3prozentiger Magermilchlösung unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde, mit dem in 1,5 prozentiger Magermilchlösung (3 prozentige Magermilchlösung wurde 1:2 mit TBS verdünnt) verdünnten primären Antikörper Mouse-Anti-PCNA (1:1000) von Dako (PC 10) über Nacht bei 4°C 10rpm geschüttelt.

In 3 fünfzehnminütigen Waschschritten mit TBS wurde ungebundener primärer Antikörper entfernt und die Membran mit dem 1:2000 (in 0,7 prozentiger Magermilchlösung) verdünnten sekundären Antikörper Anti-Mouse-HRP (Dako) für 2 Stunden inkubiert. Danach wurde die Membran 5mal 20 Minuten mit TBS gewaschen.

---

### **2.2.6.5 Detektion der Proteine**

Das Prinzip dieses Nachweises beruht auf Chemolumineszenz. Der an den primären Antikörper gebundene sekundäre Antikörper ist mit der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. In der Entwicklerlösung vorhandenes Luminol wird unter Anwesenheit eines Verstärkers, durch die Peroxidase oxidiert, wobei „kaltes“ Licht emittiert und vom Film detektiert wird.

Die PVDF-Membran wurde mit je 0,125ml Detektionslösung Part1 und Part2 (ECL Western Blotting Products; Amersham GE Healthcare) für 1 Minute inkubiert. Danach wurde die Lösung durch Abtropfen sorgfältig entfernt und die Membran in eine durchsichtige Haushaltsfolie eingeschlagen. Der Blaulicht-sensitive Autoradiographiefilm (T-MAT G/R Film, Kodak) wurde auf die Membran gelegt und nach wenigen Sekunden bis Minuten, abhängig vom jeweiligen Antikörper und transferierten Proteinkonzentration wurde der Film entfernt, entwickelt und fixiert. Die Reaktion wurde durch Überführen der Membran in TBS gestoppt.

### **2.2.6.6 Strippen der PVDF-Membran**

Die Antigen (Protein)-Antikörperbindung kann durch den Vorgang des „Strippings“ aufgebrochen werden. Der Antikörper kann dadurch vollständig entfernt, und die Membran kann wieder mit Antikörper inkubiert werden. Dazu wurde die Membran in die, auf 60°C erhitzte, Strippinglösung gegeben und für 30 Minuten (in einem verschließbaren Plastikgefäß) im Wasserbad inkubiert. Nach Entfernung dieser Lösung wurde die Membran 3mal für 20 Minuten in TBS gewaschen, 10 Minuten in Aqua bidest gelegt und schließlich getrocknet. Für eine neuerliche Inkubation mit Antikörper wurde wie unter 2.2.6.4 beschrieben vorgegangen.

---

## **3 Resultate**

### **3.1 Untersuchungen der Short-term survivors (STS) and long-term Survivors des malignen pleuralen Mesothelioms (MPM) am Tissue Microarray**

#### **3.1.1 Auswertung der klinischen Daten**

Die 48 MPM Fälle, die für die TMA Konstruktion verwendet, wurden histologisch als epitheloide Mesotheliome klassifiziert. Die mittlere Überlebensrate der 26 Patienten innerhalb der LTS Gruppe (Survival >36 Monate) lag bei 50,7 Monate (Range von 36-116 Monaten), während die mittlere Überlebensrate bei den 22 Patienten der STS Gruppe (Survival <36 Monaten) bei 9,4 Monaten lag (Range <1-31 Monate). Die mittlere Überlebensrate LTS Gruppe ist um 5,4mal höher als in der STS Gruppe. Wie aus Tab.4 zu entnehmen, hatte weder das Geschlecht der Patienten noch die untersuchten Antigene einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten.

##### **3.1.1.1 MIB-1/Ki-67 Proliferations Index im Mesotheliom**

Das Ki67-Antigen ist ein Proliferationsmarker, d.h. er färbt die Zellen im Gewebe an, die sich vermehren, die so genannte Wachstumsfraktion. Während des Zellzyklus wird dieses Antigen in der G1-, S-, G2- und in der M-Phase exprimiert. Ruhende Zellen, also Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, exprimieren das Ki-67 Antigen nicht. Die Färbung für Ki-67 gibt Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors [32]. Der Klon MIB-1 war der erste Paraffin-gängige Antikörper, mit dem das Ki-67-Antigen auch in der Routineimmunhistologie dargestellt werden konnte. Die Abkürzung für MIB - steht für "made in Borstel".

---

Die immunhistochemischen Färbungen zur Detektion von Ki-67 am TMA weisen eine zeigen eine diffuse Kernfärbung. Die MIB-1/Ki-67 Immunreaktion ist signifikant unterschiedlich zwischen der LTS und STS Gruppe ( $p$  0,014, Fischer's Exakt Test; Tab.4). Der sogenannte MIB-1/Ki-67 Proliferations-Index korrelierte mit dem Überleben der Patienten in der STS und LTS Gruppe. In der LTS Gruppe haben 24/26 (92,3 %) der Patienten einen MIB1/Ki-67 Index unter 30 %, während bei der STS Gruppe 13/22 (40,9 %) der Patienten einen Index über 30 % aufweisen. Die Daten aus den immunhistochemischen Färbungen mit MIB-1/Ki-67 korrelieren mit publizierten Daten zur proliferativen Aktivität von MIB-1 im malignen Mesotheliom in Bezug auf das Überleben und den histologischen Subtyp [33, 34].

Patienten mit niedrigem MIB1/Ki-67 Index weisen ein längeres Überleben auf, als jene Patienten mit hohem MIB1/Ki-67 Index. Ähnlich verhält es sich bei den histologischen Subtypen, Mesotheliompatienten mit einem spindelzelligen Subtyp haben einen höheren MIB-1/Ki-67 Index und eine schlechtere Prognose als Patienten mit einem epitheloiden oder biphasischen Subtyp.

<b>MPM</b>	<b>Männer</b>	<b>Frauen</b>	<b>*Alter</b>	<b>*Überlebensrate</b>	<b>MIB1/Ki-67</b>
<b>Patienten</b>			Patienten Jahre (Mittelwert)	Survival in Monate (Mittelwert)	<b>Fälle &lt; 30%</b>
<b>LTS (n = 26)</b>	11	15	41 - 78 (63.7)	36 - 116 (50.7)	24/26 (92.3%)
<b>STS (n = 22)</b>	17	5	30 - 71 (57.4)	<1 - 31 (9.1)	<b>Fälle &gt; 30%</b> 13/22 (40.9%)
<b>48</b>	28	20			

\* Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

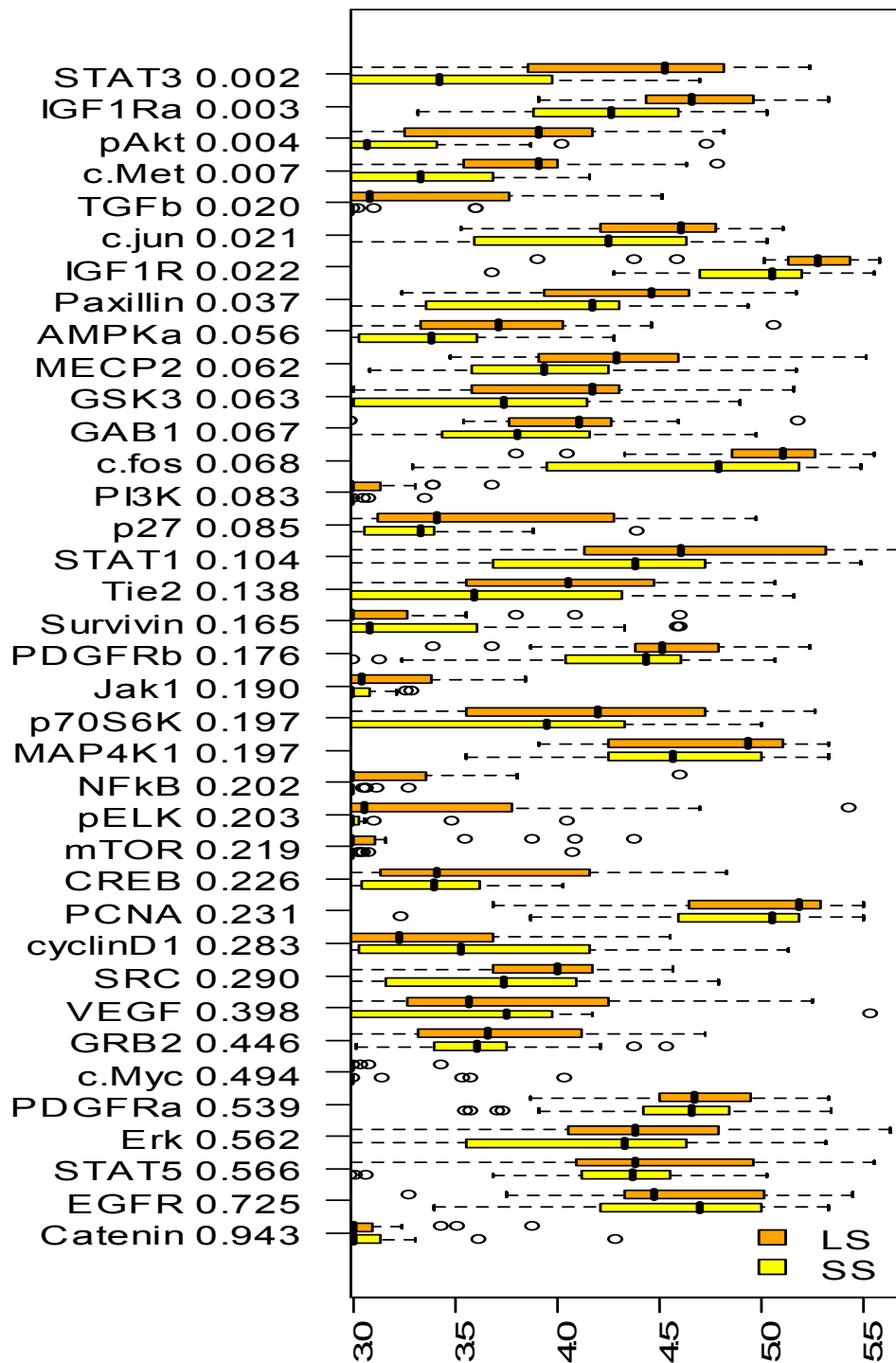
\*\* Die Überlebensrate (Survival) errechnet sich vom Zeitpunkt der Diagnose bis zum Zeitpunkt des Todes oder letzten Follow-up.

**Tabelle 4. Klinische Charakterisierung der 48 epitheloiden MPM Patienten am TMA.** Taken 36 months as cut-off level for survival 26 patients were identified as LTS and 22 as STS. Der MIB-1/Ki-67 Proliferation Index (< 30 % oder > 30 %) korreliert mit dem Überleben der Patienten in der STS und LTS Gruppe.

### 3.1.2 Statistische Analyse der immunhistochemischen Ergebnisse

#### 3.1.2.1 Quantitativer Vergleich der Proteinexpression

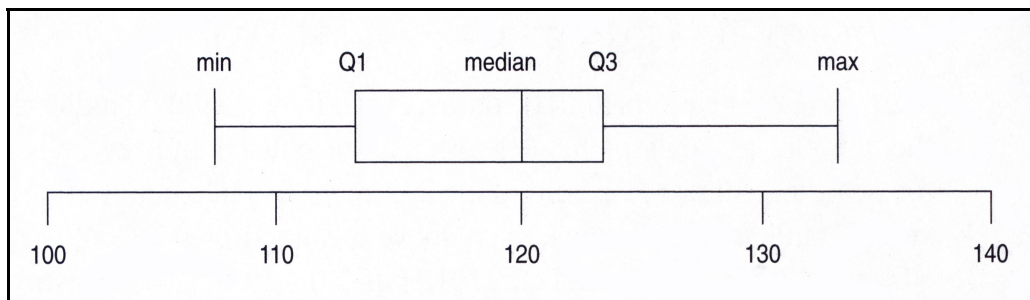
Die beschreibende und graphische Darstellung der Proteinexpression in der LTS und STS Gruppe erfolgte mit Hilfe der Whisker-Box-Plots wie in Abb.10 dargestellt. Durch die Box Plots (Box-Whisker-Plots), konnte einerseits die Proteinexpression, die durch die entsprechenden Antikörper am TMA detektiert wurde, mit dem niedrigsten und höchsten Wert definiert werden, und andererseits konnte auch die Verteilung der Daten mit den dazugehörigen Median, Streuung und Ausreißern erfasst und dargestellt werden.



**Abbildung 10. Darstellung der Proteinexpressions-Profile in LTS und STS am TMA.** Die Proteinexpression in der LTS (orange Box-Plots) und STS (gelbe Box-Plots) Gruppe, welche durch die korrespondierenden Antikörper am TMA detektiert wurde, sind graphisch durch Whisker-Box-Plots dargestellt. Der daraus resultierende Produkt Score wurde nach  $\log_2(x+20)$  transformiert und ist auf der horizontalen Achse dargestellt. Auf der vertikalen Achse sind die Proteine/Antikörper entsprechend ihrer Signifikanz ( $p < 0,05$ ) aus dem Vergleich der Mittelwerte für beide Gruppen gelistet. Die p-Werte wurden durch den Vergleich der Mittelwerte ausgehend vom Produkt Score nach Wilcoxon Rank Sum Test ermittelt.

---

Als Box wird das durch die Quartile bestimmte Rechteck bezeichnet. Sie umfasst 50 % der Daten. Die Länge der Box entspricht dem Interquartilsabstand (Interquartile Range, IQR). Dies ist ein Maß der Streuung, welches durch die Differenz des oberen und unteren Quartils bestimmt wird. Als weiteres Quartil ist der Median in der Box definiert, welcher durch seine Lage innerhalb der Box einen Hinweis auf die Verteilung der Daten gibt. Als Whisker werden die horizontalen/vertikalen Linien bezeichnet (Abb.11) [35].



**Abbildung 11. Whisker-Box-Plot.**

Der quantitative Vergleich der Proteinexpression für jedes einzelne Protein/Antikörper erfolgte durch den Vergleich der errechneten Mittelwerte nach dem Wilcoxon Rank Sum Test zwischen der LTS und STS Gruppe, wie auch in Abb.10 dargestellt. Die daraus für jedes Protein/Antikörper resultierenden p-Werte (signifikant  $p < 0,05$ ) geben Aufschluss über die Unterschiede in der Proteinexpression zwischen der LTS und der STS Gruppe und können entsprechend ihrem p-Wert gereiht werden. Der Vergleich ergab das in der LTS Gruppe die Proteine STAT3, IGFR1a, pAKT, c-Met, TGF- $\beta$ , c-Jun, IGF1R und Paxillin signifikant höher exprimiert wurden als in der STS Gruppe (Abb.10).

---

### **3.1.2.2 Global Test Goeman's Global Test**

Zahlreiche Proteine die am TMA analysiert wurden zeichneten sich dadurch aus, dass sie im Parenchym nicht oder schwach exprimiert werden, während sie im Vergleich zum Tumorgewebe um ein vielfaches höher exprimiert werden.

Mit dem Goeman Global Test wird das Expressionsprofil einer Gruppe von Genen oder Proteinen mit einer bestimmten Phänotyp assoziiert (z. B. Überleben) und auf Signifikanz dieser Assoziation getestet [36]. Der globale Vergleich der Proteinexpression am TMA mit dem Goeman Global Test ergab, dass der Unterschied in der Proteinexpression, zwischen der LTS und der STS Gruppe hoch signifikant unterschiedlich ist ( $p < 0,009$ ).

### **3.1.2.3 Korrelationen Netzwerke**

Die Bestimmung der Korrelationskoeffizienten für jeden einzelnen Antikörper innerhalb jeder Gruppe erfolgte mittels Spearman Rank Test. Die Korrelationsdifferenzen, die aus dem Vergleich der Proteinexpressionsprofile beider Gruppen hervorgehen wurden auch graphisch auch als Netzwerke dargestellt. Die Erstellung dieser Netzwerke erfolgte durch das Programm Graphviz. Graphviz ist ein Open-Source-Programmpaket zur Visualisierung von Objekten und deren Beziehungen untereinander. Mathematisch betrachtet visualisiert Graphviz gerichtete und ungerichtete Graphen.

Higher correlations in STS:				Higher correlations in LTS:			
Protein 1	Protein 2	Korrelations- differenz	p	Protein 1	Protein 2	Korrelations- differenz	p
PDGFRa	Tie2	0.77	0.036	EGFR	PCNA	1.01	0.004
PDGFRb	Tie2	0.78	0.045	EGFR	STAT3	0.80	0.027
PDGFRa	GSK3	0.73	0.039	EGFR	c-jun	0.70	0.038
PDGFRa	c-fos	0.73	0.035	EGFR	Tie2	0.86	0.013
PDGFRa	PCNA	0.70	0.045	EGFR	c-fos	0.65	0.046
PDGFRb	cyclinD1	0.67	0.049	Erk	pAkt	0.84	0.027
STAT1	p27	0.96	0.013	pELK	pAkt	0.82	0.047
STAT1	Survivin	0.76	0.025	Erk	pELK	0.81	0.028
STAT1	GRB2	0.77	0.029	GAB1	Jak1	0.67	0.047
Survivin	Erk	0.91	0.012	IGF1R	TGFb	0.87	0.005
Survivin	c-jun	0.85	0.022	PCNA	TGFb	0.87	0.007
Survivin	PCNA	0.73	0.032				
IGF1R	MECP2	0.87	0.017				
MAP4K1	SRC	0.69	0.042				

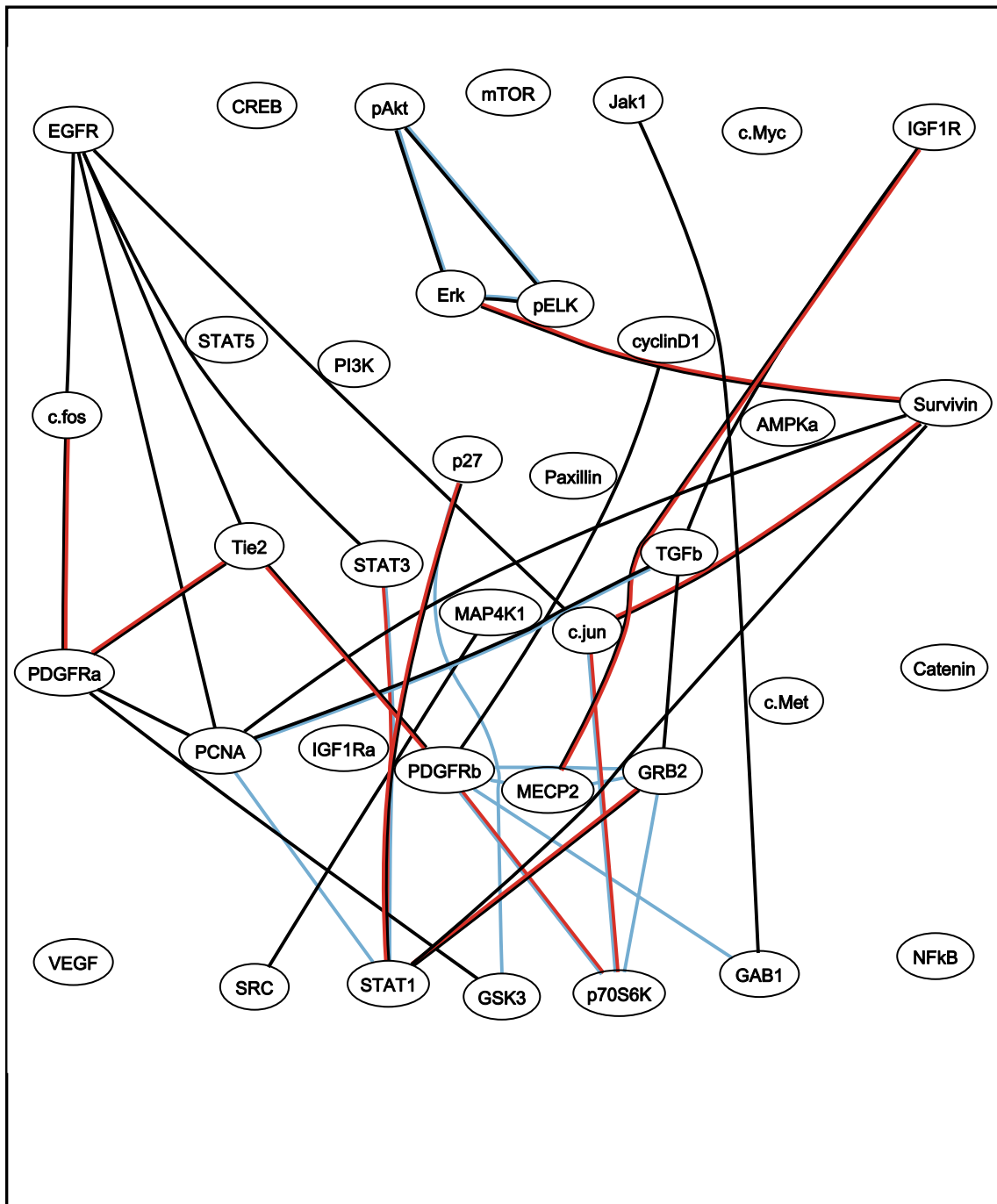
**Tabelle 5. Korrelationsdifferenzen in der STS und LTS Gruppe.** Die resultierenden signifikanten Korrelationsdifferenzen ( $p < 0,05$ ) zwischen der STS und der LTS Gruppe sind entsprechend ihrer Differenz entweder auf der linken (STS Gruppe) oder rechten Seite (LTS Gruppe) der Tabelle dargestellt.

---

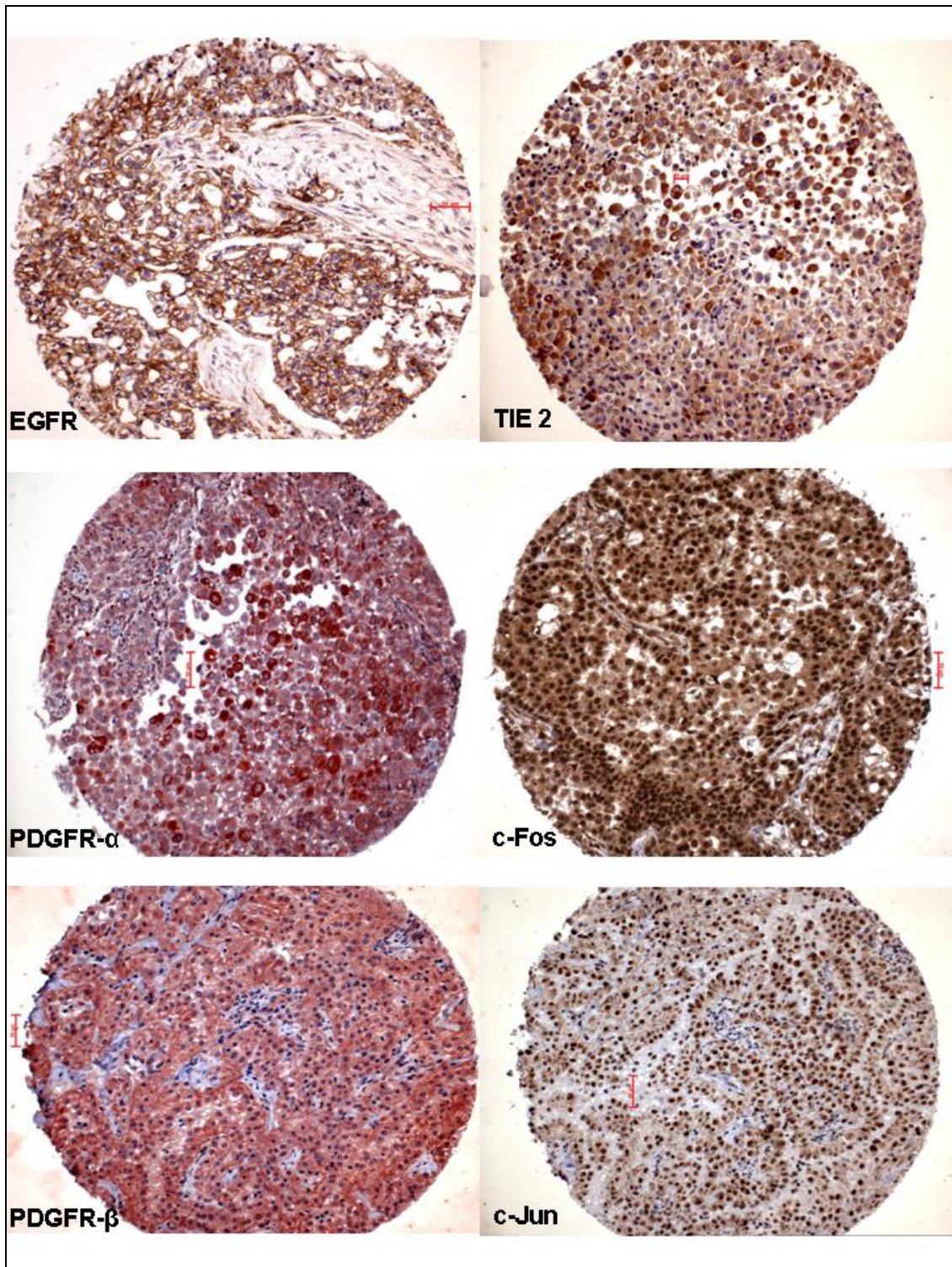
In Tab. 5 sind die signifikanten Unterschiede (Korrelationsdifferenzen) zwischen STS und LTS dargestellt. Den kompletten Datensatz, bestehend aus 666 Korrelationen für die LTS und jeweils 666 Korrelationen für die STS Gruppe, und die daraus resultierenden Korrelationsdifferenzen aus beiden Gruppen sind online als Supplementary unter <http://thoraxbmj.com/content/vol63/issue4> abrufbar [37]. In Abb.12 ist ein Netzwerk, das die Korrelationen und Korrelationsdifferenzen (korrespondierenden Daten dazu sind in Tab.5 aufgelistet) der immunhistochemischen Nachweise darstellt, abgebildet.

Ein sogenanntes Netzwerk besteht aus Knoten und Kanten. Die Knoten (nodes) repräsentieren die Antikörper bzw. die Proteine die durch diese Antikörper detektiert werden dar, während die Kanten (edges) die Beziehung (Korrelation) zwischen den Knoten anzeigen. Die Positionierung der Knoten im Netzwerk erfolgte durch den Neato Algorithmus. Signifikante Differenzen in den Korrelationen deuten auf einen Umschaltmechanismus innerhalb der der Signaling Pathways [38].

Eine repräsentative Auswahl immunhisotchemischer Antikörperfärbungeng am TMA für einzelne Gewebestanzne ist in Abb.13a und Abb.13b dargestellt.

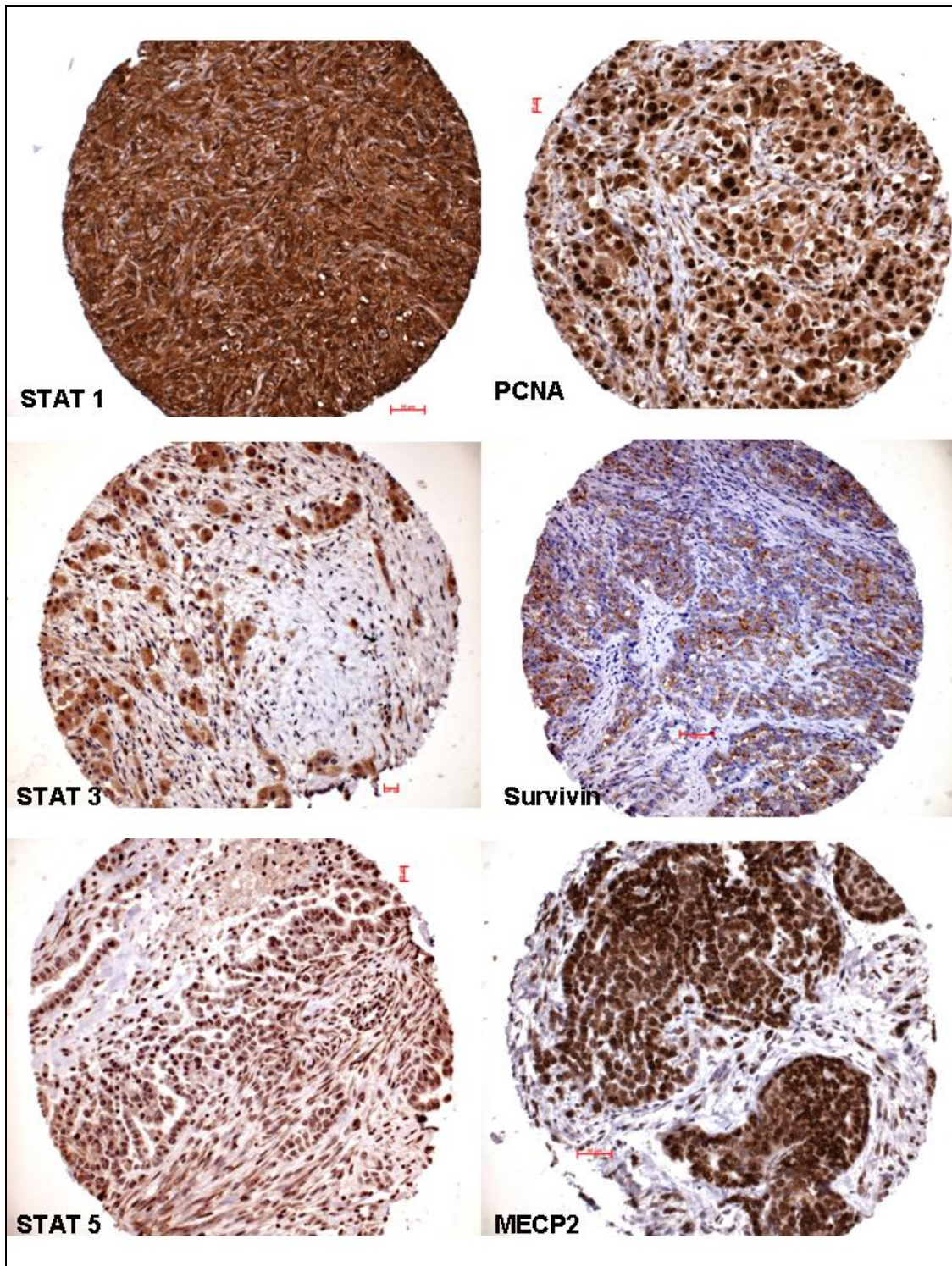


**Abbildung 12. Netzwerk, graphische Darstellung der signifikanten Korrelationen/Korrelationsdifferenzen in den LTS und STS MPM-Patienten.** Ein sogenanntes Netzwerk besteht aus Knoten und Kanten. Die Knoten (nodes) repräsentieren die Antikörper bzw. die Proteine die durch diese Antikörper detektiert werden, während die Kanten (Linien) die Beziehung (Korrelation) zwischen den Knoten anzeigen. Zwischen den Antikörpern bestehen 666 Korrelationsmöglichkeiten, in der Graphik sind nur Korrelationen  $>0,7$  angezeigt. Die blauen Linien zeigen die Korrelation innerhalb der long-term Survivors (LTS) und die Linien in rot die Korrelationen in den short-term Survivors und die schwarzen Linien zeigen die Korrelationsdifferenzen zwischen LTS und STS ( $p < 0,05$ ) an.



a)

**Abbildung 13. Immunhistochemische Färbungen am Mesotheliom TMA.** Abb.13a zeigt einzelne Mesotheliomgewebe-Stanzen am TMA für EGFR, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , TIE2, c-Fos und c-Jun.



**Abb.13b. Immunohistochemische Färbungen am Mesotheliom TMA.** Abb.13b zeigt einzelne Mesotheliomgewebe-Stanzen am TMA für STAT1, STAT3, STAT5, PCNA, Survivin und MECP2.

---

## **3.2 siPCNA Transfektion in humanen Mesotheliomzelllinien**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Transfektion der Mesotheliomzelllinien mit synthetischen siRNA-Molekülen methodisch etabliert. Hierfür wurde ein Target ausgewählt, das aufgrund der Datenlage der vorangegangenen immunhistochemischen Analyse als potenzielles Target einzustufen ist. Die Effekte des spezifischen PCNA Silencings wurden unter verschiedenen Gesichtspunkten untersucht, wobei ein Schwerpunkt auf Veränderungen der globalen Genexpression lag. Das Silencing durch siRNA stellt ein geeignetes Modellsystem dar, um die Auswirkungen eines spezifischen Inhibitors zu simulieren.

### **3.2.1 Hintergrund PCNA (proliferating cell nuclear antigen)**

Das Gen für PCNA, befindet sich am Chromosom 20pter-p12 und codiert ein Protein mit einem Molekulargewicht von 36 kDa, welches im Zellkern lokalisiert ist. Von PCNA sind zwei Transkriptvarianten bekannt, welche beide für das gleiche Protein codieren. In seiner funktionellen Form bildet PCNA Homotrimere aus und interagiert mit zahlreichen Partnermolekülen. PCNA spielt in Säugerzellen eine Schlüsselrolle, indem es diese Partnermoleküle räumlich und zeitlich organisiert. So wirkt es zum einen als Teil einer Signalkette, welche die Zellzyklusprogression reguliert, zum anderen ist es als Co-Faktor der DNA-Polymerase  $\delta$  an der DNA-Neusynthese beteiligt. Intrazellulär liegt PCNA in zwei Formen vor: Eine Form ist DNA gebunden, während die nukleoplasmatische Fraktion eine Art Reservepool darstellt.

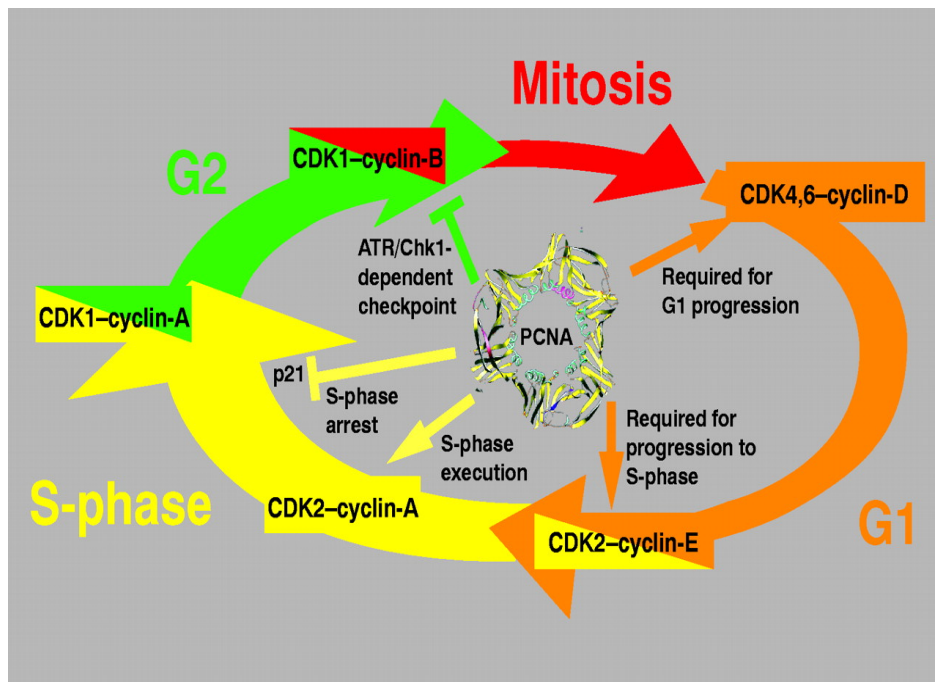
---

### **Zelluläre Interaktionen von PCNA:**

- DNA-Replikation
- DNA-Reparatur
- Zellzyklus-Kontrolle
- Chromatin-Metabolismus
- Genexpression
- Schwester-Chromatin-Kohäsion
- Apoptose

### **PCNA-Bindungsproteine bzw-Interaktionspartner [39]:**

DNA Polymerase, Clamp loader, Flap Endonuclease, DNA Ligase, Topoisomerase, Replikations Licensing Faktor, E3 Ubiquitin Ligasen, E2 SUMO-conjugating Enzyme, Helikasen, ATPasen, Mismatch Repair Enzyme, Base Excisions Repair Enzyme, Nucleotid Excision Repair Enzyme, Poly ADP Ribose Polymerase, Histon Chaperone, Chromatin Remodeling Faktor, Histon Acetyltransferase, Histon Deacetyltransferase, DNA Methyltransferase, Schwester-Chromatin Kohäsionsfaktors, Protein Kinasen, Zell-Zyklus Regulatoren, Apoptotische Faktoren.



**Abbildung 14: Zelluläre Interaktionen und Interaktionspartner von PCNA im Zellzyklus [40].**

### 3.2.2 Effizienz der siPCNA Sequenzen

Mit Hilfe der RNA-Interferenz kann die Expression eines sequenzspezifischen Targets inhibiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die humanen MPM Zelllinien mit siRNA gegen PCNA (proliferating cell nuclear antigen) transfiziert. Insgesamt wurden vier verschiedene siRNAs verwendet. Alle siRNA Sequenzen wurden nach firmeneigenen Algorithmen konstruiert, chemisch synthetisiert und mittels HPLC und Massenspektrometrie analysiert. Die Reinheit lag bei über 90%.

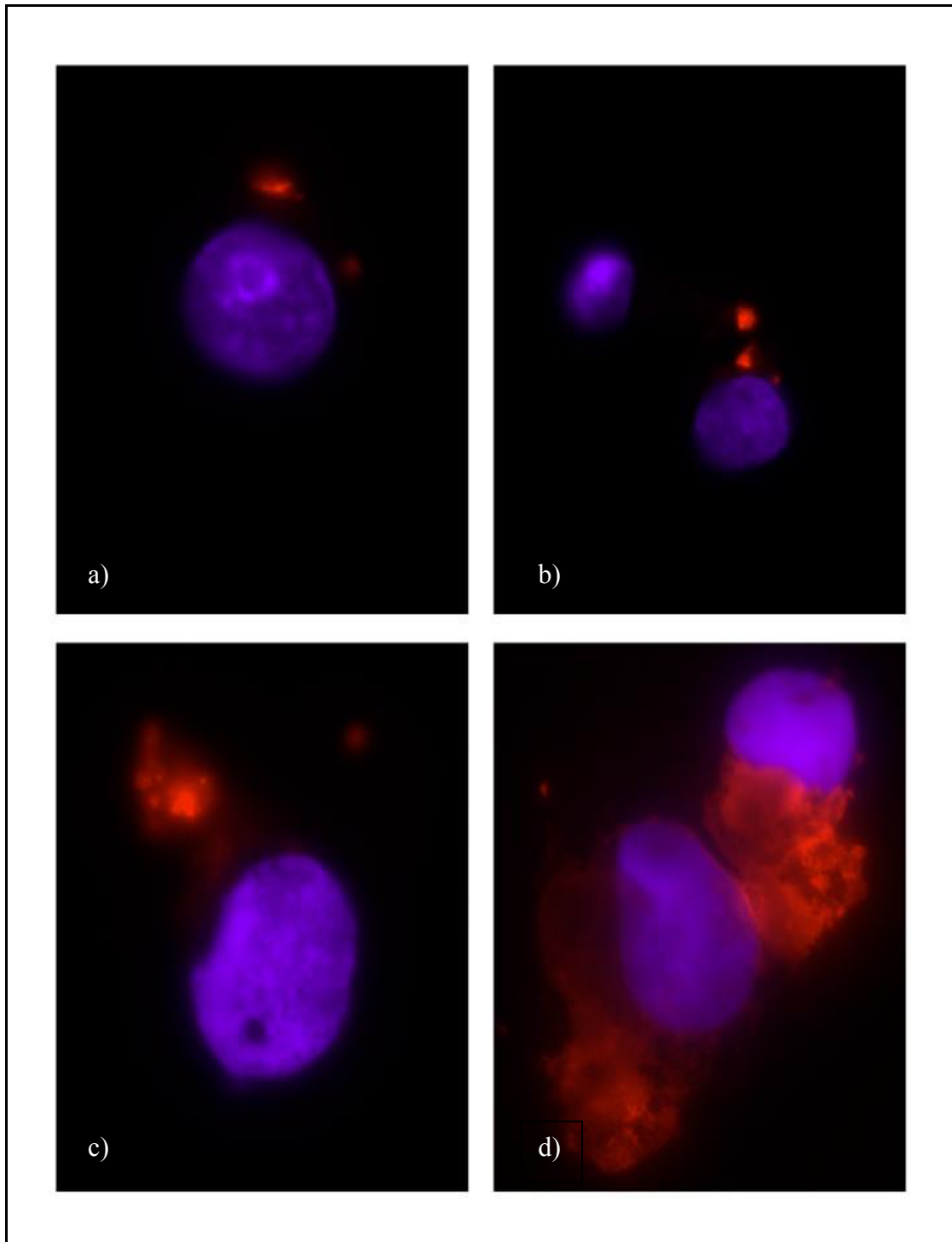
Die Mesotheliomzellen CRL-5915 und MSTO-211H wurden einzeln mit verschiedenen siRNA Konzentrationen transfiziert und die Transfektionsbedingungen dazu optimiert. Der Erfolg eines siRNA Experimentes ist vor allem abhängig von der Sequenz der verwendeten siRNAs und der effizienten Aufnahme in die behandelten Zellen. Daher müssen die optimalen Transfektionsbedingungen für jede Zelllinie ausgetestet werden.

---

Der Erfolg eines siRNA Experimentes ist vor allem abhängig von der Sequenz der verwendeten siRNAs und der effizienten Aufnahme in die behandelten Zellen. Daher müssen die optimalen Transfektionsbedingungen für jede Zelllinie ausgetestet werden. Zur Bestimmung der besten Transfektionsbedingungen wurden unterschiedliche Parameter wie siRNA-Konzentration, Zelldichte und Konzentration des Transfectionsreagens (Lipofectamin 2000) kombiniert. Der Aufnahme der siPCNA in die Zellen wurde mittels Rhodamin markierten siRNA im Fluoreszenzmikroskop angezeigt, und so die optimalen Transfektionsbedingungen ermittelt (Abb. 15).

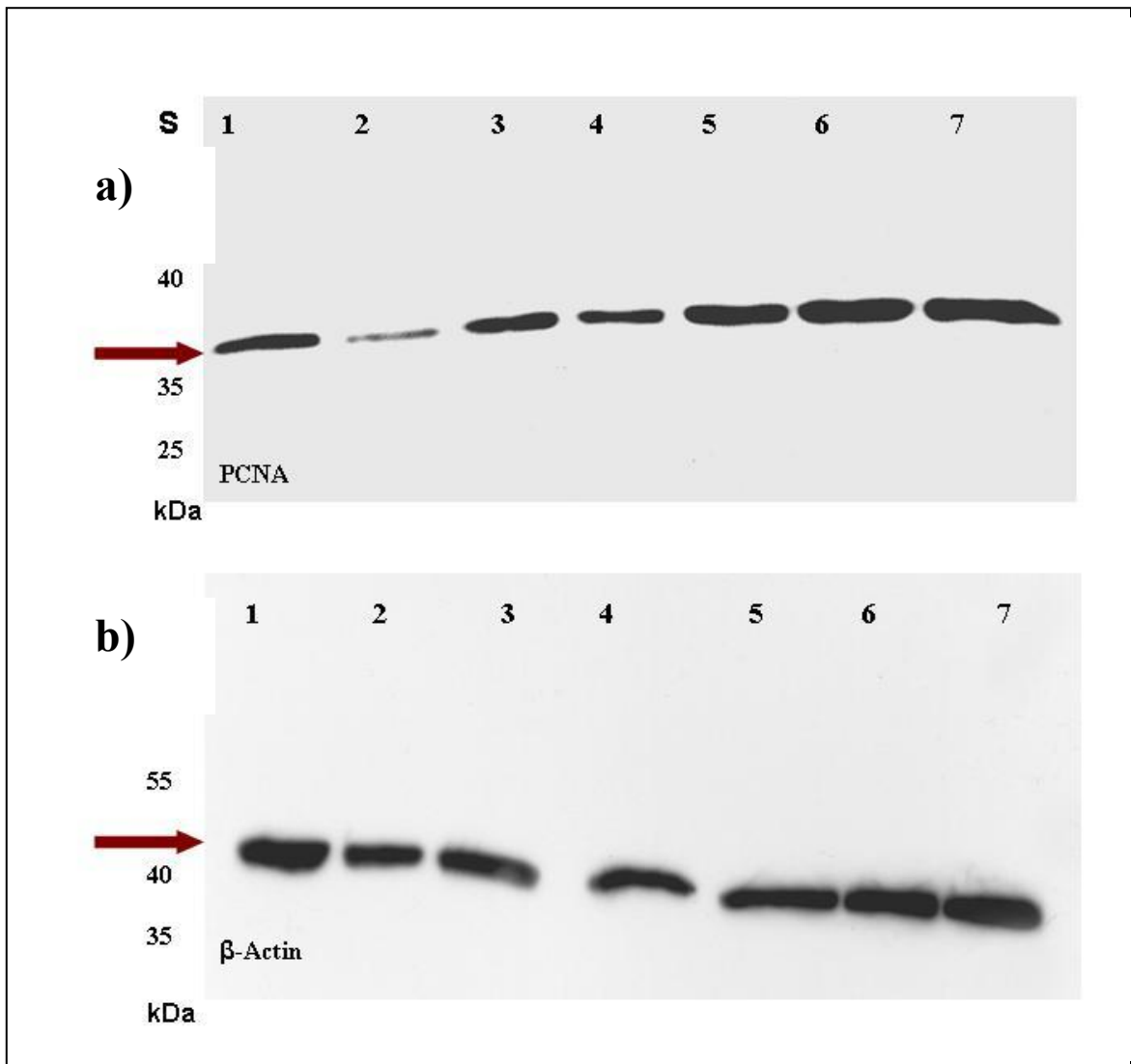
Die Zellen CRL-5915 und MSTO-221H wurden mit Rhodamin markierter siRNA transfiziert. 2 h nach der Transfektion mit Lipofectamine™ (Invitrogen) wurde die Transfektionseffizienz mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss Axioplan, Jena, Germany) bestimmt.

Die Rhodamine markierte siRNA, die ins Zytoplasma der Zellen aufgenommen wurde erscheint rot, die Zellkerne wurden mit DAPI (4', 6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbt. Die DAPI Färbung der Zellkerne wurde gemacht, um die Lokalisation der siRNA innerhalb der Zelle anzuzeigen. Die Bedingungen, die einer Transfektionsrate von mehr als 85% ergaben sind in Abb. 15d darstellt und die Durchführung im Methodenteil unter 2.2.3 angegeben.

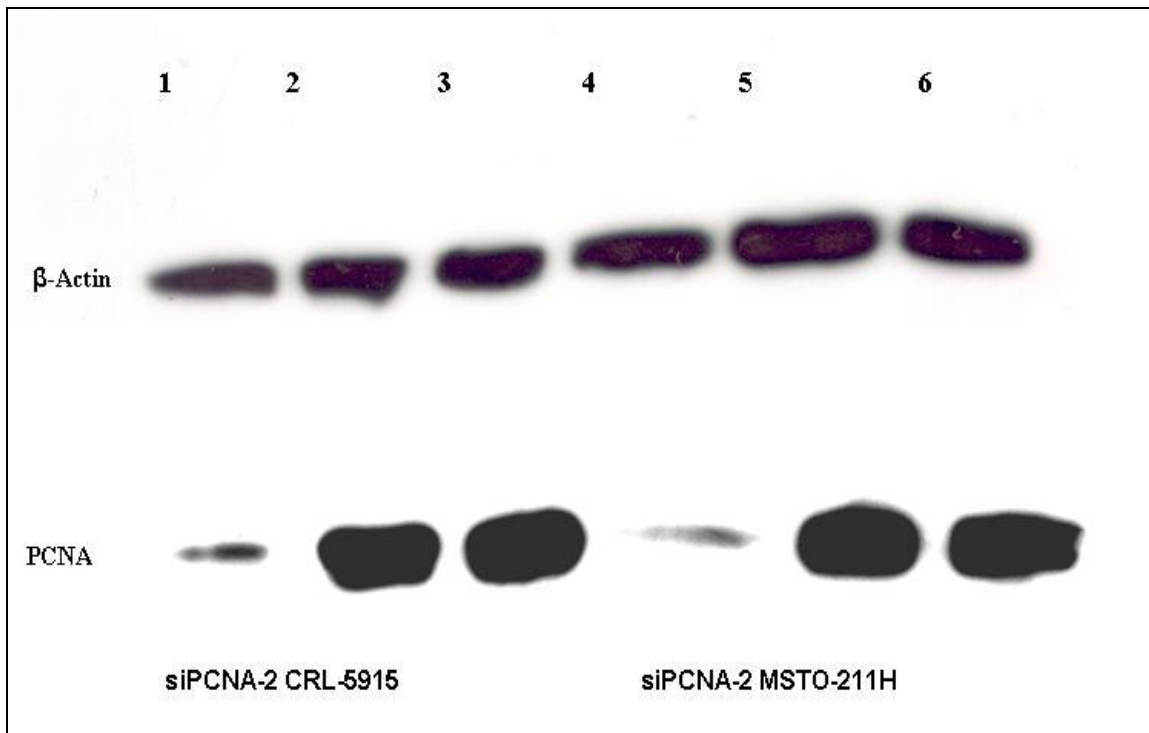


**Abbildung 15. Effizienzüberprüfung der siPCNA in den Mesotheliomzelllinien.** Die Zellen CRL-5915 und MSTO-221H wurden mit Rhodamin markierter siRNA transfiziert. 2 h nach der Transfektion mit Lipofectamine™ (Invitrogen) wurde die Transfektionseffizienz mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops bestimmt. Die Rhodamin markierte siRNA, die von den Zellen ins Zytoplasma aufgenommen wurde erscheint rot, die DAPI gefärbten Zellkerne erscheinen blau. Die siRNA in der Zelle ist in ansteigender Konzentration (a-d) abgebildet.

### 3.2.3 Western Blot Analyse von siPCNA in Mesotheliomzelllinien



**Abbildung 16. siPCNA Knockdown Western Blot Analyse.** Die Proteinextrakte, 20  $\mu$ g Totalprotein, wurden über ein 12prozentiges SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF Membran transferiert. Auf dem Western Blot sind die vier verschiedenen siRNA Sequenzen gegen PCNA (Spur 1-4), Positivkontrolle, (Spur 5), Negativkontrolle (Spur 6) und Wachstumskontrolle (Spur 7). Nach einer Detektionszeit von 1min kann auf Höhe von 36 kDa ein deutliches Signal festgestellt werden (a). siPCNA-2 (Spur 2) zeigt eine deutliche Reduktion der Proteinexpression von PCNA im Vergleich zu den siPCNA 1, 3, 4 Sequenzen (Spur 1, 3 und 4) sowie zu den Kontrollen. PCNA Antikörper (PC 10; Dako M879); Sekundärantikörper: Polyclonal Rabbit Anti-Mouse IgG HRP-conjugated (Dako; P0260). ECL-Detektion: RPN2106 (Amersham). Die Ladekontrolle  $\beta$ -Actin ist in b) dargestellt.  $\beta$ -Actin Antikörper 42 kDa (AC 15 Sigma-Aldrich). S: Protein ladder (Fermentas #SM0661) 1: siRNA PCNA-1; 2: siRNA PCNA-2; 3: siRNA PCNA-3; 4: siRNA PCNA-4; 5: Positivkontrolle (Lamin A/C); 6: Negativkontrolle (mit gleichen Konz. Lipofectamine 2000); 7: Wachstumskontrolle (ohne siRNA und Lipofectamine).



**Abbildung 17. siPCNA-2 Knockdown in CRL-5915 und MST0-211H.** Die Proteinextrakte der behandelten Zelllinien, 20 µg Totalprotein, wurden über ein 12prozentiges SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF Membran transferiert. Auf dem Western Blot ist nur die siRNA Sequenz gegen PCNA-2 (Spur 1, 4), Positivkontrolle, (Spur 2, 5), und Wachstumskontrolle (Spur 3, 6). Nach einer Detektionszeit von 1min kann deutliches Signal festgestellt werden. (a). siPCNA-2 (Spur 2) zeigt eine deutliche Reduktion der Proteinexpression von PCNA im Vergleich zu den Kontrollen. PCNA Antikörper (PC 10; Dako M879); Sekundärantikörper: Polyclonal Rabbit Anti-Mouse IgG HRP-conjugated (Dako; P0260). ECL-Detektion: RPN2106 (Amersham). Ladekontrolle β-Actin ist in Abb. b) dargestellt. β-Actin Antikörper 42 kDa (AC 15 Sigma-Aldrich).

---

### **3.3 Genexpressionsanalyse von siPCNA am Human Whole Genom Array**

#### **3.3.1 Qualitätsreports der Arrays**

Die Qualität eines Arrays wurde anhand mehrerer Parameter beurteilt, die über den Erfolg der Hybridisierung, das Signal-Rausch-Verhältnis sowie Hersteller- oder methodische Artefakte Auskunft geben. Die Agilent-Software Feature Extraction (Version 9.1.3.1) generiert für jeden Array einen QC (Qualitätskontrolle) Report, indem die Prozessierung sowie die Reproduzierbarkeit der einzelnen Arbeitsschritte dokumentiert ist. In den Abb.18a-d sind 4 QC Reports für die durchgeführten Einfarben-Experimente (1-colour Hybridisierung) abgebildet.

Nach dem Scannen der Arrays wurden die Daten mittels extrahiert und auf die Qualität überprüft. In diesen QC Reports werden die Arrays beurteilt auf Background, Noise (Rauschen), Signalintensität (Minimum- und Maximumwert), die Detektionslimit (Sättigung), Lineare Range der Signalintensitäten, Spotfinding, Kontrollen (SpikeIns). Außerdem wurde visuell überprüft, ob der von der Software erzeugte Raster (Grid), auf dem die Zuordnung der Features beruhte, auch korrekt ausgerichtet wurde. Nur Arrays die diese Parameter innerhalb des QC Reports erfüllten, wurden für die nachfolgende Datenanalyse (siehe 3.3.2 herangezogen).

**Abbildung 18. Qualitäts Reports der Hybridisierung.**

In Abb. 18a: siPCNA-2 Knockdown in CRL-5915

In Abb.18b: Non-Silencing siRNA in CRL-5915

In Abb.18c: siPCNA-2 Knockdown in MSTO-211H

In Abb.18d: Non-Silencing siRNA in MSTO-211H

**Abb. 18a: siPCNA-2 Knockdown in CRL-5915.**

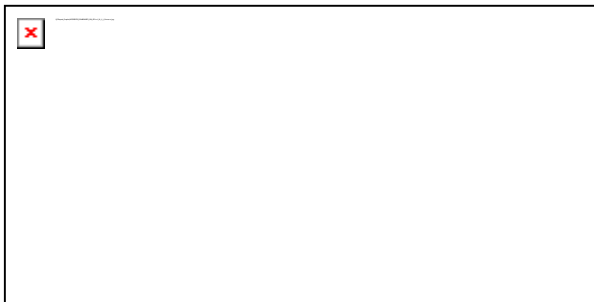
**QC Report - Agilent Technologies : 1 Color Gene**

**siPCNA-2 in CRL-5915**

**Expression**

Date	Wednesday, October 11, 2006 - 17:10	Grid	014850_D_20060807
Image	US23502370_251485010972_S01_H [1_1]	BG Method	No Background
Protocol	GE1-v1_91 (Read Only)	Background	On(FeatNCRange)
User Name	kothmaierh	Multiplicative Detrend	True
FE Version	9.1.3.1	Additive Error	10(Green)
		Saturation Value	580872 (g)

**Spot Finding of the Four Corners of the Array**



**Grid Normal**

<b>Feature</b>	<b>Local</b>
	<b>Background</b>
Green	Green

Non Uniform	17	28
-------------	----	----

**Net Signal Statistics**

**Agilent SpikeIns:**

Green

# Saturated Features	0
99% of Sig. Distrib.	469467
50% of Sig. Distrib.	3324
1% of Sig. Distrib.	45

**Non-Control probes:**

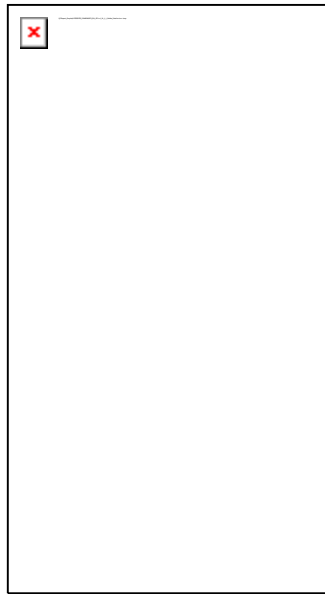
Green

Population	17	637
------------	----	-----

# Saturated Features	0
99% of Sig. Distrib.	100825
50% of Sig. Distrib.	260
1% of Sig. Distrib.	41

**Spatial Distribution of All Outliers on the Array**

532 rows x 85 columns



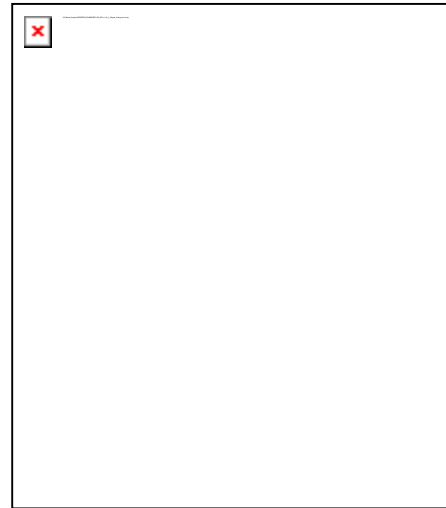
# FeatureNonUnif (Green) = 17(0.04%)

# GeneNonUnif (Green) = 12 (0.028 %)

- BG NonUniform
- BG Population
- Green FeaturePopulation
- Green Feature NonUniform

**Negative Control Stats**

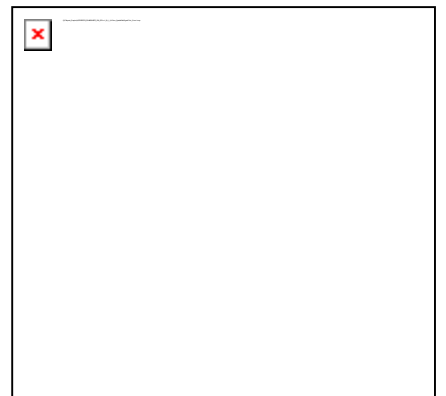
**Histogram of Signals Plot**



# Features (NonCtrl) with BGSubSignal < 0: 5431 (Green)

**Spatial Distribution of Median**

**Signals for each**



**Row**

**Spatial Distribution of Median**

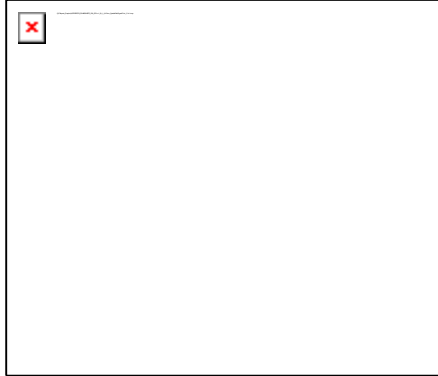
Green **Signals for each Column**

Average Net Signals	65.13
StdDev Net Signals	11.44
Average BG Sub Signal	-6.59
StdDev BG Sub Signal	7.49

**Local Bkg (inliers)**

Green

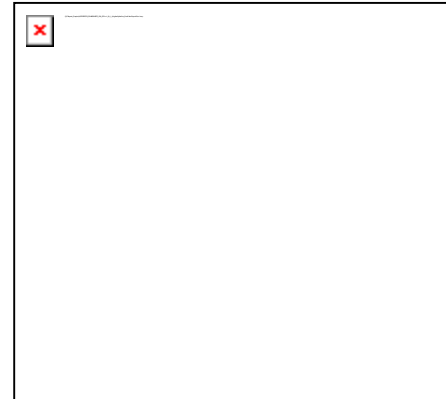
**Agilent SpikeIns: Log(Signal) vs. Log(Relative concentration) Plot**



Number	44376
Avg	60.05
SD	2.79

**Foreground Surface Fit**

Green



RMS_Fit	10.25
RMS_Resid	9.68
Avg_Fit	100.63

**Multiplicative Surface Fit**

Green

RMS_Fit	0.09
---------	------

**Reproducibility: %CV for Replicated Probes**

Median %CV Signal (inliers)

Non-Control  
Agilent SpikeIns  
probes

Green                  Green

BGSubSignal	14.45	14.29
ProcessedSignal	9.11	8.78

**Agilent Spike-In Concentration-Response Statistics**

**Linear Range Statistics:**

**Agilent SpikeIns Signal Statistics**

Probe Name	Log(Relative Median(Log Conc.))	Proc. Sig.)	% CV	StdDev
(+)E1A_r60_3	0.30	1.06	66.43	0.33
(+)E1A_r60_a104	1.30	1.17	49.66	0.53
(+)E1A_r60_a107	2.30	1.97	17.20	0.07
(+)E1A_r60_a135	3.30	3.00	8.75	0.04
(+)E1A_r60_a20	3.83	3.43	8.10	0.04
(+)E1A_r60_a22	4.30	4.00	9.97	0.04
(+)E1A_r60_a97	4.82	4.43	8.83	0.04
(+)E1A_r60_n11	5.30	4.97	9.09	0.04
(+)E1A_r60_n9	5.82	5.24	8.78	0.04
(+)E1A_r60_1	6.30	5.64	7.72	0.03

Low Signal	1.16
High Signal	5.56
Low Relative Concentration	1.39
High Relative Concentration	6.03
Slope	0.95
R^2 Value	1.00

**Signal Detection Limit Statistics**

**Agilent SpikeIns: %CV of Avg. Processed Signal Plot**



Median %CV:8.78

Saturation Point	5.76
Low Threshold	0.84
Low Threshold Error	0.63
Spike-In Detection Limit	1.31

**In Abb.18b: Non-Silencing siRNA in CRL-5915.**

**QC Report - Agilent Technologies : 1 Color Gene Expression**

**Non-Silencing siRNA  
in CRL-5915**

Date Wednesday, October 11, 2006 - 17:11 Grid 014850\_D\_20060807

Image US23502370\_251485010972\_S01\_H [1\_2] BG Method No Background

Protocol GE1-v1\_91 (Read Only) Background On(FeatNCRRange)  
Detrend

User Name kothmaierh Multiplicative True  
Detrend

FE Version 9.1.3.1 Additive Error 9(Green)  
Saturation Value 580961 (g)

**Spot Finding of the Four Corners of the Array**



**Grid Normal**

<b>Feature</b>	<b>Local</b>	<b>Background</b>
Green	Green	Green

Non Uniform	28	42
Population	30	1292

**Spatial Distribution of All Outliers on the Array**

532 rows x 85 columns

**Net Signal Statistics**

**Agilent SpikeIns:**

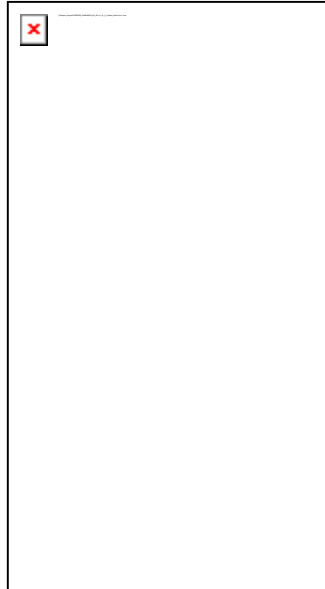
Green

# Saturated Features	0
99% of Sig. Distrib.	474357
50% of Sig. Distrib.	3721
1% of Sig. Distrib.	77

**Non-Control probes:**

Green

# Saturated	0
-------------	---



# FeatureNonUnif (Green) = 28(0.06%)

# GeneNonUnif (Green) = 24 (0.056 %)

- BG NonUniform
- BG Population
- Green FeaturePopulation
- Green Feature NonUniform

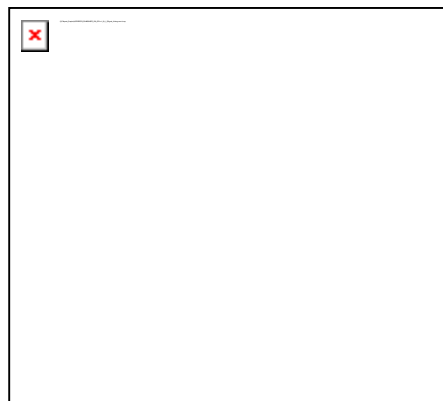
### Negative Control Stats

Green

Average Net Signals	70.71
StdDev Net Signals	6.79
Average BG Sub Signal	-7.71
StdDev BG Sub Signal	5.32

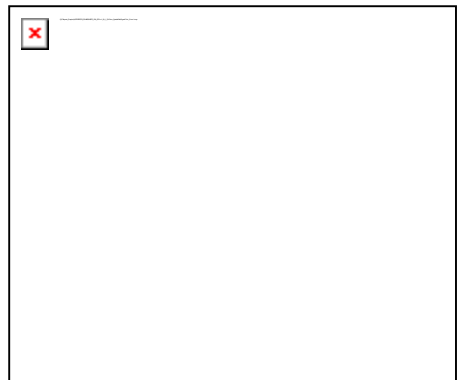
Features	
99% of Sig. Distrib.	96473
50% of Sig. Distrib.	272
1% of Sig. Distrib.	63

### Histogram of Signals Plot



# Features (NonCtrl) with BGSubSignal < 0: 4972 (Green)

### Spatial Distribution of Median Signals for each Row

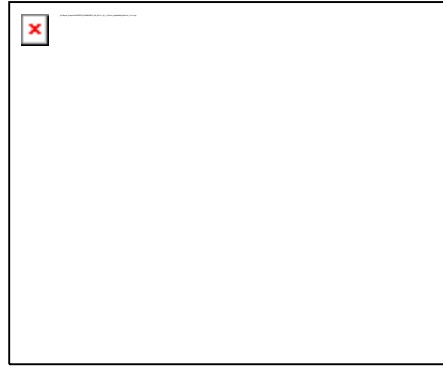


### Spatial Distribution of Median Signals for each Column

**Local Bkg (inliers)**

Green

Number	43719
Avg	60.56
SD	2.48

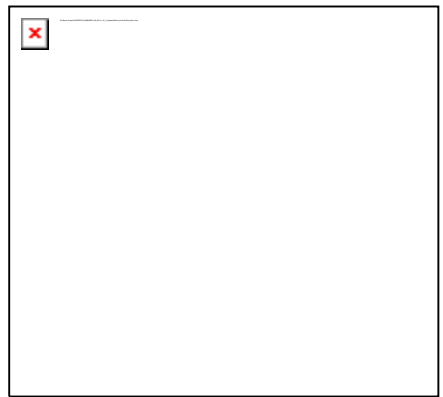


**Agilent SpikeIns: Log(Signal) vs. Log(Relative concentration) Plot**

**Foreground Surface Fit**

Green

RMS_Fit	3.78
RMS_Resid	8.81
Avg_Fit	108.22



**Agilent Spike-In Concentration-Response Statistics**

**Linear Range Statistics:**

**Multiplicative Surface Fit**

Green

RMS_Fit	0.11
---------	------

**Reproducibility: %CV for Replicated Probes**

	Median %CV Signal (inliers)	
	Non-Control probes	Agilent SpikeIns
	Green	Green
BGSubSignal	17.18	16.25
ProcessedSignal	10.19	8.79

Low Signal	1.19
High Signal	5.57
Low Relative Concentration	1.39
High Relative Concentration	6.02
Slope	0.95
R^2 Value	1.00



**Abb.18c: siPCNA-2 Knockdown in MSTO-211H.**

**QC Report - Agilent Technologies : 1 Color Gene Expression**

**siPCNA-2 in  
MSTO-211H**

Date	Wednesday, October 11, 2006 - 17:11	Grid	014850_D_20060807
Image	US23502370_251485010972_S01_H [1_3]	BG Method	No Background
Protocol	GE1-v1_91 (Read Only)	Background Detrend	On(FeatNCRRange)
User Name	kothmaierh	Multiplicative Detrend	True
FE Version	9.1.3.1	Additive Error	8(Green)
		Saturation Value	581008 (g)

**Spot Finding of the Four Corners of the Array**



**Grid Normal**

Feature	Local Background	Green	Green
Non Uniform	11	23	
Population	62	990	

**Spatial Distribution of All Outliers on the Array**

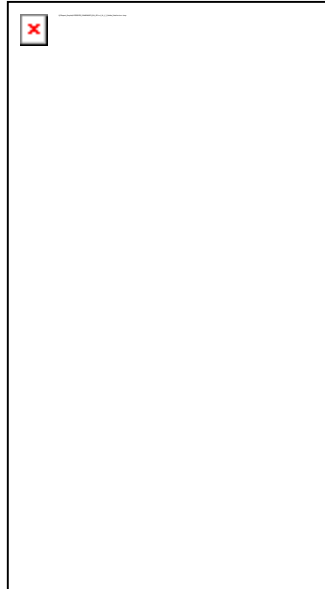
532 rows x 85 columns

**Net Signal Statistics**

**Agilent SpikeIns:**

Green

# Saturated Features	0
99% of Sig. Distrib.	490550
50% of Sig. Distrib.	4172



# FeatureNonUnif (Green) = 11(0.02%)

# GeneNonUnif (Green) = 9 (0.021 %)

- BG NonUniform
- BG Population
- Green FeaturePopulation
- Green Feature NonUniform

**Negative Control Stats**

Green

Average Net Signals	73.92
StdDev Net Signals	6.33
Average BG Sub Signal	-5.79
StdDev BG Sub Signal	4.77

1% of Sig. Distrib.	80
---------------------	----

**Non-Control probes:**

Green

# Saturated Features	0
----------------------	---

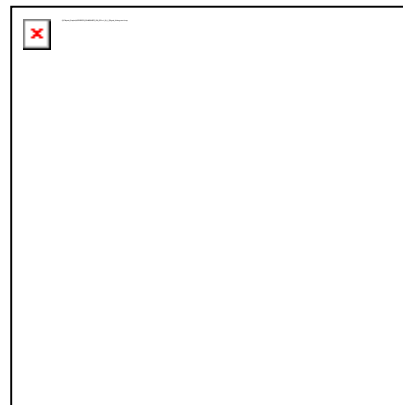
99% of Sig. Distrib.	72789
----------------------	-------

50% of Sig. Distrib.	255
----------------------	-----

1% of Sig. Distrib.	66
---------------------	----

# Features (NonCtrl) with BGSubSignal < 0: 4592 (Green)

**Histogram of Signals Plot**



**Local Bkg (inliers)**

Green

Number	44025
Avg	60.35
SD	2.43

**Foreground Surface Fit**

Green

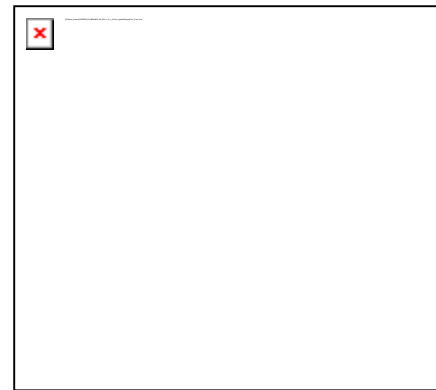
RMS_Fit	3.93
RMS_Resid	7.54
Avg_Fit	109.49

**Multiplicative Surface Fit**

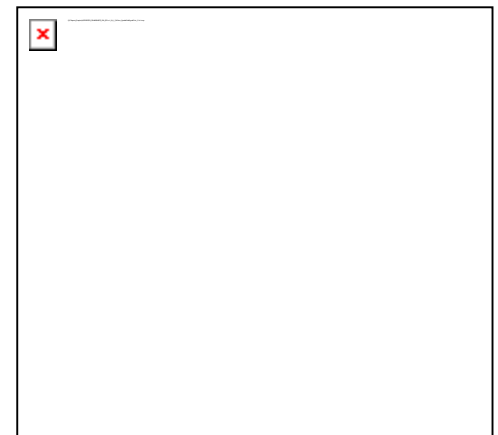
Green

RMS_Fit	0.07
---------	------

**Spatial Distribution of Median Signals for each Row**



**Spatial Distribution of Median Signals for each Column**



**Reproducibility: %CV for Replicated Probes**

Median %CV Signal (inliers)

Non-Control probes      Agilent SpikeIns

Green                      Green

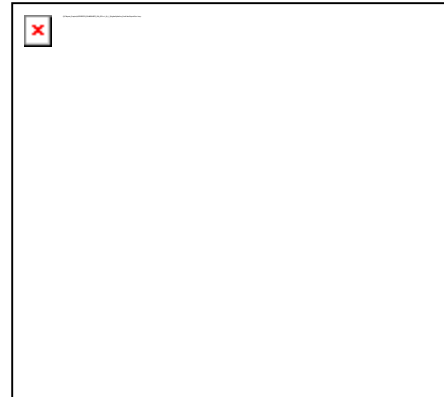
BGSubSignal	11.48	11.19
ProcessedSignal	7.57	6.63

**Agilent SpikeIns Signal Statistics**

Probe Name      Log(Relative Median(Log  
Conc.) Proc. Sig.)      % CV StdDev

(+)E1A_r60_3	0.30	0.94	67.77	0.41
(+)E1A_r60_a104	1.30	1.34	58.46	0.17
(+)E1A_r60_a107	2.30	2.10	9.40	0.04
(+)E1A_r60_a135	3.30	3.14	7.96	0.04
(+)E1A_r60_a20	3.83	3.56	6.63	0.03
(+)E1A_r60_a22	4.30	4.07	7.21	0.03
(+)E1A_r60_a97	4.82	4.54	6.40	0.03
(+)E1A_r60_n11	5.30	5.09	7.21	0.03
(+)E1A_r60_n9	5.82	5.32	4.98	0.02
(+)E1A_r60_1	6.30	5.67	6.44	0.03

**Agilent SpikeIns: Log(Signal) vs.  
Log(Relative concentration) Plot**



**Agilent Spike-In Concentration-  
Response Statistics**

**Linear Range Statistics:**

**Agilent SpikeIns: %CV of Avg. Processed Signal Plot**



Median %CV:6.63

Low Signal	1.13
High Signal	5.54
Low Relative Concentration	1.14
High Relative Concentration	5.94
Slope	0.92
R^2 Value	1.00

**Signal Detection Limit Statistics**

Saturation Point	5.76
Low Threshold	0.76
Low Threshold Error	0.44
Spike-In Detection Limit	1.23

**Abb.18d: Non-silencing siRNA in MSTO-221H.**

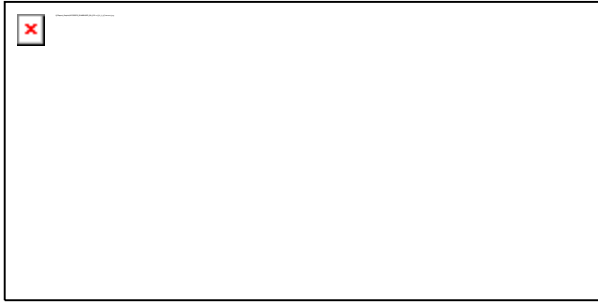
**QC Report - Agilent Technologies : 1 Color Gene Expression**

**Non-siRNA in MSTO-211H**

Date	Wednesday, October 11, 2006 - 17:12	Grid	014850_D_20060807
Image	US23502370_251485010972_S01_H [1_4]	BG Method	No Background
Protocol	GE1-v1_91 (Read Only)	Background Detrend	On(FeatNCRRange)
User Name	kothmaierh	Multiplicative Detrend	True
FE Version	9.1.3.1	Additive Error Saturation Value	8(Green) 580287 (g)

**Spot Finding of the Four Corners of the Array**

**Net Signal Statistics**



**Grid Normal**

	<b>Local</b>
<b>Feature</b>	<b>Background</b>
Green	Green

Non Uniform	31	34
Population	46	785

**Spatial Distribution of All Outliers on the Array**

532 rows x 85 columns



**Agilent SpikeIns:**

Green

# Saturated Features	1
99% of Sig. Distrib.	515642
50% of Sig. Distrib.	4661
1% of Sig. Distrib.	78

**Non-Control probes:**

Green

# Saturated Features	2
99% of Sig. Distrib.	93131
50% of Sig. Distrib.	218
1% of Sig. Distrib.	69

**Histogram of Signals Plot**

# FeatureNonUnif (Green) = 31(0.07%)

# GeneNonUnif (Green) = 20 (0.047 %)

- BG NonUniform
- BG Population
- Green FeaturePopulation
- Green Feature NonUniform

### Negative Control Stats

Green

Average Net Signals	75.47
StdDev Net Signals	6.18
Average BG Sub Signal	-6.68
StdDev BG Sub Signal	4.79

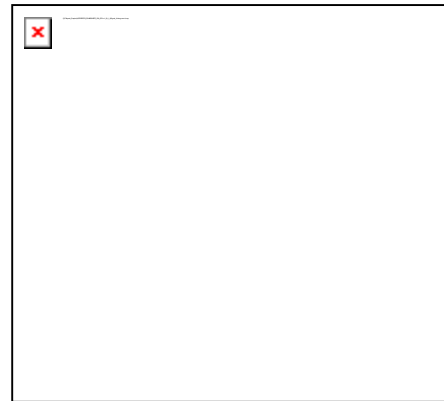
### Local Bkg (inliers)

Green

Number	44228
Avg	59.46
SD	2.15

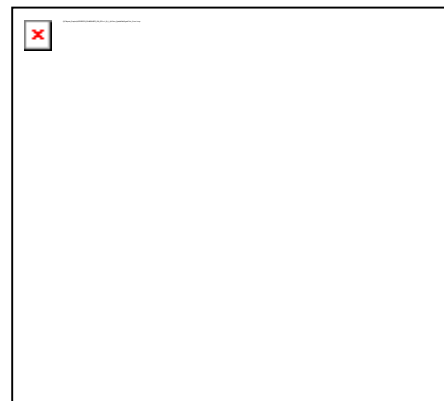
### Foreground Surface Fit

Green

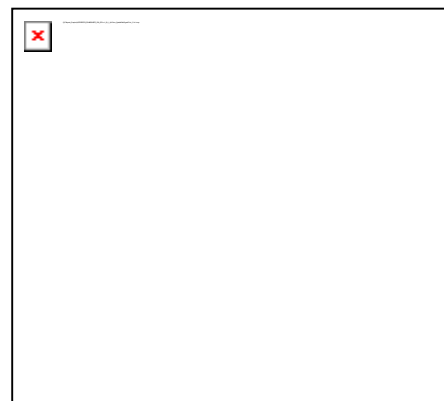


# Features (NonCtrl) with BGSubSignal < 0: 5080 (Green)

### Spatial Distribution of Median Signals for each Row



### Spatial Distribution of Median Signals for each Column



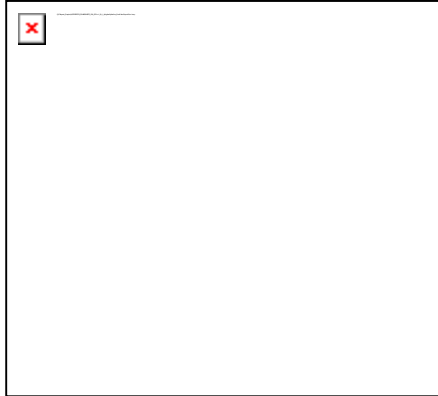
### Agilent SpikeIns: Log(Signal) vs.

**Log(Relative concentration) Plot**

RMS_Fit	3.76
RMS_Resid	7.59
Avg_Fit	112.13

**Multiplicative Surface Fit**

Green



RMS_Fit	0.08
---------	------

**Agilent Spike-In Concentration-Response Statistics**

**Reproducibility: %CV for Replicated Probes**

Median %CV Signal (inliers)

Non-Control probes	Agilent SpikeIns
Green	Green

**Linear Range Statistics:**

BGSubSignal	14.12	13.51
ProcessedSignal	7.73	6.73

Low Signal	1.22
High Signal	5.53
Low Relative Concentration	1.22
High Relative Concentration	5.84
Slope	0.93
R^2 Value	1.00

**Agilent SpikeIns Signal Statistics**

Probe Name	Log(Relative Median(Log Conc.))	Log(Proc. Sig.)	% CV	StdDev
------------	---------------------------------	-----------------	------	--------

**Signal Detection Limit Statistics**

(+)E1A_r60_3	0.30	1.00	71.72	0.38
(+)E1A_r60_a104	1.30	1.33	56.25	0.18
(+)E1A_r60_a107	2.30	2.17	9.24	0.04
(+)E1A_r60_a135	3.30	3.16	7.86	0.03
(+)E1A_r60_a20	3.83	3.58	7.14	0.03
(+)E1A_r60_a22	4.30	4.13	6.71	0.03

Saturation Point	5.76
Low Threshold	0.84

(+)E1A_r60_a97	4.82	4.60	6.73	0.03
(+)E1A_r60_n11	5.30	5.16	6.22	0.03
(+)E1A_r60_n9	5.82	5.39	4.74	0.02
(+)E1A_r60_1	6.30	5.68	7.88	0.03

Low	
Threshold	0.42
Error	
Spike-In	
Detection	1.25
Limit	

**Agilent SpikeIns: %CV of Avg. Processed Signal Plot**



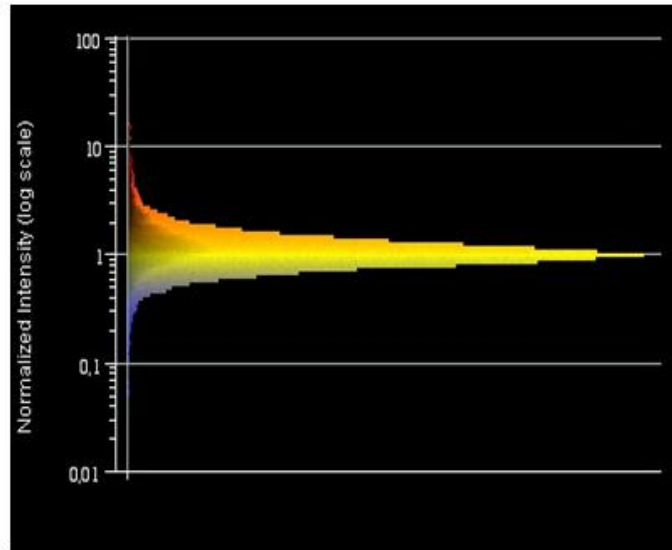
Median %CV:6.73

Die durch Feature Extraction ermittelten Rohdaten wurden in GeneSpring GX importiert und für die weitere Datenanalyse verwendet. GeneSpring GX (Agilent) ist eine spezielle Software zur Visualisierung und Analyse von Genexpressionsdaten. Das Ziel der Datenauswertung ist es, einerseits möglichst alle differenziell exprimierten Gene zu erfassen, also die Zahl der falsch-negativen Ergebnisse auf ein Minimum zu reduzieren, andererseits aber auch die falsch-positiven Ergebnisse zu vermeiden, indem nur verlässlich detektierte Signale und robuste Änderungen einbezogen werden [41]. Dafür wurden die Datensätze einem mehrstufigen Prozess unterzogen, der im folgendem aufgelistet ist.

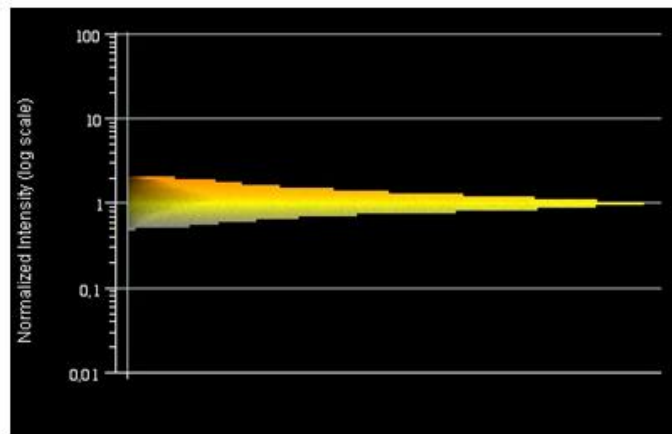
---

### Datenauswertung mit GeneSpring

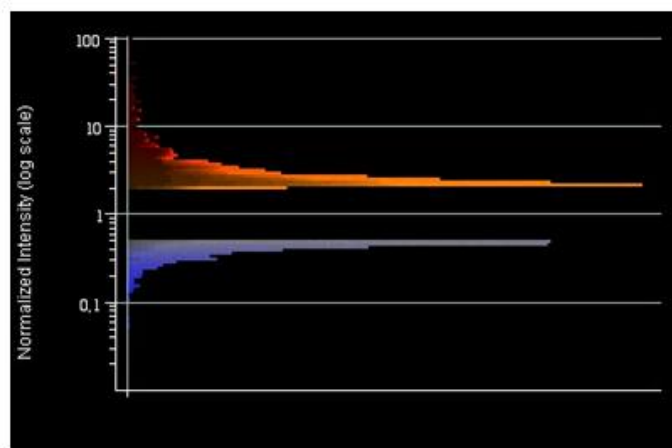
- **Normalisierung der Signalintensitäten**
- **Zusammenfassung biologischer Replikate**
- **Vergleich Probe versus Kontrolle: Der Effekt siPCNA-2 versus Non-silencing siRNA wird gemessen.**
- **Fold change: Dieser Faktor gibt an, um welchen Faktor sich das Signal einer Probe im Vergleich zur Kontrolle geändert hat. Gene innerhalb von fold change +2/-2 liegen wurden nicht in die Analyse einbezogen.**
- **Filtern der Daten, um verlässliche detektierte und gleichzeitig zwischen Probe und Kontrolle signifikante veränderte Signale zu identifizieren.**



**a)** Alle Gene nach Normalisierung und erfolgtem Flag pass.



**b)** Gene innerhalb von Fold change + 2 und -2 wurden nicht in die Analyse einbezogen.



**c)** Gene größer /kleiner Fold change +2/-2 wurden für weitere Analysen verwendet.

**Abbildung 19. Darstellung der Gene nach der Normalisierung.** a) zeigt die Gene, die innerhalb von Fold change +2 und -2 liegen, nicht in die Analyse einbezogen; b) zeigt die Gene die außerhalb vom fold change +2 / -2 liegen, diese wurden für die weiteren Analysen verwendet.

**Tabelle 6. Signifikant deregulierte Gen nach siPCNA-2 Knockdown in Mesotheliomzelllinien (vor dem Bonferoni Test).**

**Tab. 6a Down-regulierte Gene:**

**Signifikant down- regulierte Gene nach siPCNA knockdown in MPM Zelllinien**

<b>Genbank</b>	<b>Description</b>
NM_014109	Homo sapiens ATPase family, AAA domain containing 2 (ATAD2), mRNA [NM_014109]
NM_138764	Homo sapiens BCL2-associated X protein (BAX), transcript variant epsilon, mRNA [NM_138764] Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)
NM_002546	(TNFRSF11B), mRNA [NM_002546]
NM_024094	Homo sapiens defective in sister chromatid cohesion homolog 1 (S. cerevisiae) (DCC1), mRNA [NM_024094]
NM_017785	Homo sapiens hypothetical protein FLJ20364 (FLJ20364), mRNA [NM_017785]
NM_004346	Homo sapiens caspase 3, apoptosis-related cysteine protease (CASP3), transcript variant alpha, mRNA [NM_004346]
NM_006716	Homo sapiens activator of S phase kinase (ASK), mRNA [NM_006716]
NM_003686	Homo sapiens exonuclease 1 (EXO1), transcript variant 3, mRNA [NM_003686]
NM_003219	Homo sapiens telomerase reverse transcriptase (TERT), transcript variant 1, mRNA [NM_003219]
NM_000484	Homo sapiens amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease) (APP), transcript variant 1, mRNA [NM_000484] Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434B231 (from clone DKFZp434B231). [AL137667]
NM_000930	Homo sapiens plasminogen activator, tissue (PLAT), transcript variant 1, mRNA [NM_000930]
NM_017998	Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 40 (C9orf40), mRNA [NM_017998]
NM_002727	Homo sapiens proteoglycan 1, secretory granule (PRG1), mRNA [NM_002727]
NM_002296	Homo sapiens lamin B receptor (LBR), transcript variant 1, mRNA [NM_002296]
NM_001008708	Homo sapiens similar to RIKEN cDNA 2510006C20 gene (LOC494143), mRNA [NM_001008708]
CR625990	full-length cDNA clone CS0DI074YB14 of Placenta Cot 25-normalized of Homo sapiens (human) [CR625990]
NM_014325	Homo sapiens coronin, actin binding protein, 1C (CORO1C), mRNA [NM_014325]
NM_018132	Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 139 (C6orf139), mRNA [NM_018132] Homo sapiens eyes absent homolog 4 (Drosophila) (EYA4), transcript variant 1, mRNA
NM_004100	[NM_004100]
NM_012137	Homo sapiens dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1), mRNA [NM_012137] full-length cDNA clone CS0DC019YC18 of Neuroblastoma Cot 25-normalized of Homo sapiens
CR610885	(human)

---

[CR610885]  
Homo sapiens MRS2-like, magnesium homeostasis factor (*S. cerevisiae*) (MRS2L), mRNA

NM\_020662 [NM\_020662]

AK124768 Homo sapiens cDNA FLJ42778 fis, clone BRAWH3005146. [AK124768]

AK026668 Homo sapiens cDNA: FLJ23015 fis, clone LNG00818. [AK026668]

NM\_000506 Homo sapiens coagulation factor II (thrombin) (F2), mRNA [NM\_000506]

NM\_016269 Homo sapiens lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF1), mRNA [NM\_016269]

NM\_175866 Homo sapiens U2AF homology motif (UHM) kinase 1 (UHMK1), mRNA [NM\_175866]

NM\_001216 Homo sapiens carbonic anhydrase IX (CA9), mRNA [NM\_001216]

NM\_032793 Homo sapiens major facilitator superfamily domain containing 2 (MFSD2), mRNA [NM\_032793]

NM\_001012968 Homo sapiens hypothetical protein LOC139886 (LOC139886), mRNA [NM\_001012968]

CR749471 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp781I1117 (from clone DKFZp781I1117). [CR749471]

NM\_000576 Homo sapiens interleukin 1, beta (IL1B), mRNA [NM\_000576]

NM\_022566 Homo sapiens mesoderm development candidate 1 (MESDC1), mRNA [NM\_022566]

NM\_004134 Homo sapiens heat shock 70kDa protein 9B (mortalin-2) (HSPA9B), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM\_004134]

NM\_002982 Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), mRNA [NM\_002982]

AF131762 Homo sapiens clone 25218 mRNA sequence. [AF131762]

NM\_198066 Homo sapiens glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1 (GNPNAT1), mRNA [NM\_198066]

NM\_001001336 Homo sapiens cytochrome b5 reductase 2 (CYB5R2), transcript variant 2, mRNA [NM\_001001336]

NM\_198066 Homo sapiens glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1 (GNPNAT1), mRNA [NM\_198066]

NM\_198974 Homo sapiens PTK9 protein tyrosine kinase 9 (PTK9), transcript variant 2, mRNA [NM\_198974]

NM\_032466 Homo sapiens aspartate beta-hydroxylase (ASPH), transcript variant 3, mRNA [NM\_032466]

NM\_198974 Homo sapiens PTK9 protein tyrosine kinase 9 (PTK9), transcript variant 2, mRNA [NM\_198974]

NM\_005573 Homo sapiens lamin B1 (LMNB1), mRNA [NM\_005573]

NM\_002592 Homo sapiens proliferating cell nuclear antigen (PCNA), transcript variant 1, mRNA [NM\_002592]

---

## Tab. 6b. Up-regulierte Gene

### Signifikant up-regulierte Gene nach siPCNA knockdown in MPM Zelllinien

Genbank	Description
NM_021116	Homo sapiens adenylate cyclase 1 (brain) (ADCY1), mRNA [NM_021116] Homo sapiens mRNA for B-cell neoplasia associated transcript, (BCMS gene), splice variant G, non coding transcript.
AJ412029	[AJ412029] Homo sapiens cDNA FLJ35216 fis, clone PROST2000277, highly similar to Homo sapiens
AK092535	sulfonylurea receptor 2B (SUR2) gene. [AK092535]
NM_000900	Homo sapiens matrix Gla protein (MGP), mRNA [NM_000900]
NM_000639	Homo sapiens Fas ligand (TNF superfamily, member 6) (FASLG), mRNA [NM_000639]
AK074578	Homo sapiens cDNA FLJ90097 fis, clone HEMBA1005929, weakly similar to H.sapiens mRNA for serine/threonine protein kinase EMK. [AK074578]
NM_173858	Homo sapiens vomeronasal 1 receptor 5 (VN1R5), mRNA [NM_173858] Q6IQD8 (Q6IQD8) Zgc:56665 protein, partial (12%) [THC2408099]
AK094650	Homo sapiens cDNA FLJ37331 fis, clone BRAMY2019600. [AK094650]
NM_032432	Homo sapiens actin binding LIM protein family, member 2 (ABLIM2), mRNA [NM_032432] Homo sapiens solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 10 (SLC5A10),
NM_152351	mRNA [NM_152351]
BC020624	Homo sapiens, clone IMAGE:4809416, mRNA, partial cds. [BC020624] BF477426 nac60f03.x1 NCI_CGAP_Brn23 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3438845 3' similar
BF477426	to contains element MER37 repetitive element ;mRNA sequence [BF477426]
NM_152595	Homo sapiens piggyBac transposable element derived 4 (PGBD4), mRNA [NM_152595]
AF119886	Homo sapiens PRO2591 mRNA, complete cds. [AF119886] AA471010 ne22a06.s1 NCI_CGAP_Co3 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:881938 3' similar to
AA471010	gb:M73700 LACTOTRANSFERRIN PRECURSOR (HUMAN); EOMD_HUMAN (O95936) Eomesodermin homolog, partial (3%) [THC2337324]
AB016901	Homo sapiens HGC6.2 mRNA, complete cds. [AB016901]
NM_000815	Homo sapiens gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, delta (GABRD), mRNA [NM_000815]
NM_053006	Homo sapiens testis-specific serine kinase 2 (TSSK2), mRNA [NM_053006] Homo sapiens sperm protein associated with the nucleus, X-linked, family member A1 (SPANXA1),
NM_013453	mRNA [NM_013453]
AK021606	Homo sapiens cDNA FLJ11544 fis, clone HEMBA1002826. [AK021606]

---

NM\_018272 Homo sapiens cancer susceptibility candidate 1 (CASC1), mRNA [NM\_018272]

BX647987 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686N1452 (from clone DKFZp686N1452). [BX647987]

NM\_145664 Homo sapiens SPANX family, member B2 (SPANXB2), mRNA [NM\_145664]

AK055335 Homo sapiens cDNA FLJ30773 fis, clone FEBRA2000771. [AK055335]

NM\_014578 Homo sapiens ras homolog gene family, member D (RHOD), mRNA [NM\_014578]

AK091970 Homo sapiens cDNA FLJ34651 fis, clone KIDNE2018167. [AK091970]

Homo sapiens dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2 (DHRS2), transcript variant 1, mRNA [NM\_182908]

NM\_182908 mRNA [NM\_182908]

AB095943 Homo sapiens mRNA for KIAA2023 protein. [AB095943]

NM\_001721 Homo sapiens BMX non-receptor tyrosine kinase (BMX), mRNA [NM\_001721]

NM\_144727 Homo sapiens crystallin, gamma N (CRYGN), mRNA [NM\_144727]

Homo sapiens dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2 (DHRS2), transcript variant 1, mRNA [NM\_182908]

NM\_182908 mRNA [NM\_182908]

NM\_002371 Homo sapiens mal, T-cell differentiation protein (MAL), transcript variant a, mRNA [NM\_002371]

Homo sapiens inositol polyphosphate-5-phosphatase, 145kDa (INPP5D), transcript variant 1, mRNA [NM\_001017915]

NM\_001017915 mRNA [NM\_001017915]

BC035906 Homo sapiens, clone IMAGE:5247129, mRNA, partial cds. [BC035906]

full-length cDNA clone CS0DI061YD09 of Placenta Cot 25-normalized of Homo sapiens (human).

CR606280 [CR606280]

Homo sapiens protein C (inactivator of coagulation factors Va and VIIIa) (PROC), mRNA [NM\_000312]

NM\_000312 [NM\_000312]

XM\_114166 PREDICTED: Homo sapiens similar to KIAA0386 (LOC200230), mRNA [XM\_114166]

NM\_006151 Homo sapiens lactoperoxidase (LPO), mRNA [NM\_006151]

Homo sapiens sperm protein associated with the nucleus, X-linked, family member A1 (SPANXA1), mRNA [NM\_013453]

NM\_013453 mRNA [NM\_013453]

BX089493 Soares\_total\_fetus\_Nb2HF8\_9w Homo sapiens cDNA clone IMAGp998P111937 ;

BX089493 IMAGE:786298, mRNA sequence [BX089493]

U18288 Human clone CIITA-10 MHC class II transactivator CIITA mRNA, complete cds. [U18288]

BQ379494 CM0-UT0003-031100-582-b09 UT0003 Homo sapiens cDNA, mRNA sequence [BQ379494]

BQ379494 [BQ379494]

AF113674 Homo sapiens clone FLB1727 PRO0398 mRNA, complete cds. [AF113674]

AK055347 Homo sapiens cDNA FLJ30785 fis, clone FEBRA2000901. [AK055347]

AW076051 xa83g01.x1 NCI\_CGAP\_CML1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2573424 3' similar to TR:O75594 O75594 PEPTIDOGLYCAN RECOGNITION PROTEIN PRECURSOR. ;, mRNA sequence [AW076051]

AW076051 to TR:O75594 O75594 PEPTIDOGLYCAN RECOGNITION PROTEIN PRECURSOR. ;, mRNA sequence [AW076051]

NM\_002700 Homo sapiens POU domain, class 4, transcription factor 3 (POU4F3), mRNA [NM\_002700]

NM\_012163 Homo sapiens leucine rich repeat containing 29 (LRRC29), transcript variant 1, mRNA

[NM\_012163]

NM\_152394 Homo sapiens hypothetical protein MGC39662 (MGC39662), mRNA [NM\_152394]

NM\_053044 Homo sapiens HtrA serine peptidase 3 (HTRA3), mRNA [NM\_053044]

Homo sapiens pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6 (P2RY6), transcript variant 2,  
 NM\_176798 mRNA [NM\_176798]

601237381F1 NIH\_MGC\_44 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3609140 5', mRNA sequence  
 BE378852 [BE378852]

NM\_002022 Homo sapiens flavin containing monooxygenase 4 (FMO4), mRNA [NM\_002022]

BX647448 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp451F057 (from clone DKFZp451F057). [BX647448]

Q8MW53 (Q8MW53) Precollagen-D, partial (3%) [THC2441863]

Q6DD14 (Q6DD14) MGC80451 protein, partial (40%) [THC2340803]

NM\_020311 Homo sapiens chemokine orphan receptor 1 (CMKOR1), mRNA [NM\_020311]

AI744427 wf89b02.x1 NCI\_CGAP\_Co3 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2362731 3' similar to  
 contains  
 element MER12 repetitive element ; mRNA sequence [AI744427]

NM\_138819 Homo sapiens hypothetical protein BC017868 (RP3-473B4.1), mRNA [NM\_138819]

Homo sapiens mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase,  
 NM\_012214 isoenzyme A (MGAT4A),  
 mRNA [NM\_012214]

NM\_153330 Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 8 (DNAJB8), mRNA [NM\_153330]

NM\_032417 Homo sapiens SPANX family, member D (SPANXD), mRNA [NM\_032417]

NM\_130897 Homo sapiens dynein, cytoplasmic, light polypeptide 2B (DNCL2B), mRNA [NM\_130897]

NM\_000647 Homo sapiens chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2), transcript variant A, mRNA [NM\_000647]

Homo sapiens cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1 (CYP17A1), mRNA  
 NM\_000102 [NM\_000102]

Homo sapiens transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family) (TCN1), mRNA  
 NM\_001062 [NM\_001062]

NM\_001040 Homo sapiens sex hormone-binding globulin (SHBG), mRNA [NM\_001040]

BC031291 Homo sapiens, clone IMAGE:5300989, mRNA. [BC031291]

NM\_181724 Homo sapiens hypothetical protein LOC338773 (LOC338773), mRNA [NM\_181724]

NM\_001657 Homo sapiens amphiregulin (schwannoma-derived growth factor) (AREG), mRNA [NM\_001657]

NM\_194072 Homo sapiens spermatid-specific linker histone H1-like protein (HILS1), mRNA [NM\_194072]

NM\_012395 Homo sapiens PFTAIRE protein kinase 1 (PFTK1), mRNA [NM\_012395]

Homo sapiens clone RCJL1 lambda 1 immunoglobulin light chain variable region mRNA, partial cds.  
 AF124170 [AF124170]

Homo sapiens DNA-damage inducible protein 2, mRNA (cDNA clone MGC:14844  
 BC006011 IMAGE:4296688), complete cds.  
 [BC006011]

---

NM\_006955 Homo sapiens zinc finger protein 11B (ZNF11B), mRNA [NM\_006955]

NM\_007173 Homo sapiens protease, serine, 23 (PRSS23), mRNA [NM\_007173]

NM\_032641 Homo sapiens likely ortholog of mouse gene rich cluster, C9 gene (GRCC9), mRNA [NM\_032641]

AK055808 Homo sapiens cDNA FLJ31246 fis, clone KIDNE2005266. [AK055808]

NM\_020815 Homo sapiens protocadherin 10 (PCDH10), transcript variant 2, mRNA [NM\_020815]

AB058761 Homo sapiens mRNA for KIAA1858 protein, partial cds. [AB058761]  
Q9BVX4 (Q9BVX4) MGC5566 protein, partial (23%) [THC2438003]  
Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6 (CACNG6), transcript variant

NM\_145814 1,  
mRNA [NM\_145814]

AK025434 Homo sapiens cDNA: FLJ21781 fis, clone HEP00223. [AK025434]

NM\_031938 Homo sapiens beta-carotene dioxygenase 2 (BCDO2), mRNA [NM\_031938]

BC042028 Homo sapiens, clone IMAGE:4794726, mRNA. [BC042028]

NM\_012395 Homo sapiens PFTAIRE protein kinase 1 (PFTK1), mRNA [NM\_012395]

NM\_006763 Homo sapiens BTG family, member 2 (BTG2), mRNA [NM\_006763]

NM\_182585 Homo sapiens hypothetical protein DKFZp451M2119 (DKFZp451M2119), mRNA [NM\_182585]

NM\_052906 Homo sapiens KIAA1904 protein (KIAA1904), mRNA [NM\_052906]

NM\_175747 Homo sapiens oligodendrocyte transcription factor 3 (OLIG3), mRNA [NM\_175747]

NM\_173553 Homo sapiens hypothetical protein FLJ25801 (FLJ25801), mRNA [NM\_173553]

NM\_023915 Homo sapiens G protein-coupled receptor 87 (GPR87), mRNA [NM\_023915]  
Homo sapiens histone 1, H2ac, mRNA (cDNA clone MGC:1730 IMAGE:2988620), complete cds.  
[BC017379]

AK057830 Homo sapiens cDNA FLJ25101 fis, clone CBR01328. [AK057830]

NM\_000064 Homo sapiens complement component 3 (C3), mRNA [NM\_000064]

NM\_020896 Homo sapiens oxysterol binding protein-like 5 (OSBPL5), transcript variant 1, mRNA [NM\_020896]  
AI573267 tn03f02.x1 NCI\_CGAP\_Brn25 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2166555 3', mRNA  
sequence [AI573267]

BC063022 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5246259, partial cds. [BC063022]  
Q8IZS8 (Q8IZS8) Voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-3 subunit, partial (27%)  
[THC2376418]

NM\_133367 Homo sapiens progesterin and adipoQ receptor family member VIII (PAQR8), mRNA [NM\_133367]  
Homo sapiens cDNA FLJ11290 fis, clone PLACE1009622, weakly similar to MATERNAL EFFECT

AK002152 PROTEIN STAUFEN.  
[AK002152]  
Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 20, mRNA (cDNA clone IMAGE:4291354),

BC010934 partial cds. [BC010934]

BC032805 Homo sapiens cDNA clone MGC:45556 IMAGE:4186857, complete cds. [BC032805]

NM\_145235 Homo sapiens fibronectin type III and ankyrin repeat domains 1 (FANK1), mRNA [NM\_145235]

---

BC036767	Homo sapiens RIB43A domain with coiled-coils 1, mRNA (cDNA clone MGC:46233 IMAGE:5744127), complete cds. [BC036767]
NM_024417	Homo sapiens ferredoxin reductase (FDXR), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA [NM_024417]
NM_001613	Homo sapiens actin, alpha 2, smooth muscle, aorta (ACTA2), mRNA [NM_001613]
NM_018837	Homo sapiens sulfatase 2 (SULF2), transcript variant 1, mRNA [NM_018837]
NM_002133	Homo sapiens heme oxygenase (decycling) 1 (HMOX1), mRNA [NM_002133]
NM_002332	Homo sapiens low density lipoprotein-related protein 1 (alpha-2-macroglobulin receptor) (LRP1), mRNA [NM_002332]
NM_138578	Homo sapiens BCL2-like 1 (BCL2L1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA [NM_138578]
NM_000492	Homo sapiens cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, ATP-binding cassette (sub-family C, member 7) (CFTR), mRNA [NM_000492]

### 3.3.2 Korrektur nach Bonferroni identifiziert deregulierte Gene

Die Bonferroni-Korrektur dient dazu bei Mehrfachtests das Alpha-Niveau anzupassen. Mit dieser Korrektur wird die Alphafehler-Kumulierung, wie sie bei multiplen Paarvergleichen wie auch im vorliegenden Fall, neutralisiert. Mit der Korrektur nach Bonferroni und einer FDR von 5% (False Discovery Rate) konnte aus den signifikanten Genen nach sehr konservativen Kriterien 18 Gene identifiziert werden, die nach dem siPCNA-2 knockdown dereguliert sind. In Abb.20 sind die Intensitäten der upregulierten Gene in rot dargestellt und die downregulierten Gene in blau (log-scale). Jeder Farbbalken steht für ein Gen, die Liste der 18 deregulierten Gene ist in Tab.7 dargestellt. Die siPCNA führte in den Mesotheliomzelllinien zu einer 20-fach Erniedrigung der mRNA PCNA verglichen zu Kontrolle (scrambled siRNA), und

---

verursacht eine Deregulation weitere Gene bzw. mRNAs, wie die Expressionsanalyse zeigt.

**Deregulierten Gene geordnet nach Veränderung der Expressionshöhe (in Abb.19 b) sind die Expressionswerte graphisch dargestellt):**

### **Downregulierte Gene**

#### **20fach downreguliertes Gen**

- Homo sapiens proliferating cell nuclear antigen (PCNA), transcript variant 1, mRNA [NM\_002592]

#### **6-10fach downreguliertes Gen**

- Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), mRNA [NM\_002982]

#### **4-5fach downreguliertes Gen**

- Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 139 (C6orf139), mRNA [NM\_018132]
- Homo sapiens interleukin 1, beta (IL1B), mRNA [NM\_000576]

#### **2-3fach downregulierte Gene**

- Homo sapiens caspase 3, apoptosis-related cysteine protease (CASP3), transcript variant alpha, mRNA [NM\_004346]
- Homo sapiens defective in sister chromatid cohesion homolog 1 (S. cerevisiae) (DCC1), mRNA [NM\_024094]
- Homo sapiens BCL2-associated X protein (BAX), transcript variant epsilon, mRNA [NM\_138764]
- Homo sapiens activator of S phase kinase (ASK), mRNA [NM\_006716]
- Homo sapiens hypothetical protein FLJ20364 (FLJ20364), mRNA [NM\_017785]
- Homo sapiens exonuclease 1 (EXO1), transcript variant 3, mRNA [NM\_003686]
- Homo sapiens ATPase family, AAA domain containing 2 (ATAD2), mRNA [NM\_014109]

- 
- Homo sapiens telomerase reverse transcriptase (TERT), transcript variant 1, mRNA [NM\_003219]
  - Homo sapiens amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease) (APP), transcript variant 1, mRNA [NM\_000484]
  - Homo sapiens plasminogen activator, tissue (PLAT), transcript variant 1, mRNA [NM\_000930]

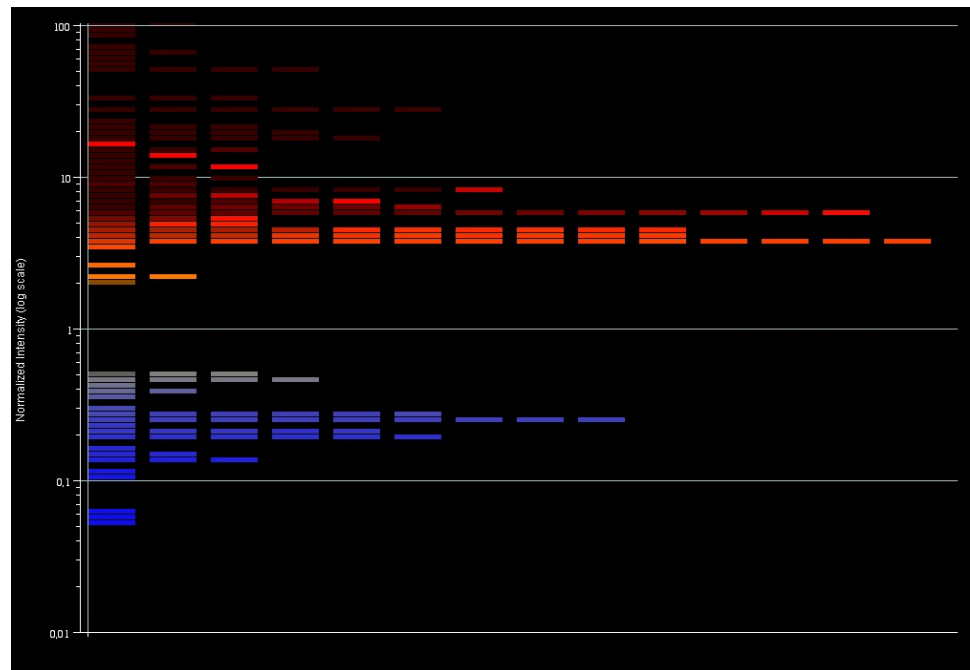
-----

### **Upregulierte Gene**

#### **2-3 fach up-regulierte Gene**

- Homo sapiens BCL2-like 1 (BCL2L1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA [NM\_138578]
- Homo sapiens heme oxygenase (decycling) 1 (HMOX1), mRNA [NM\_002133]
- Homo sapiens low density lipoprotein-related protein 1 (alpha-2-macroglobulin receptor) (LRP1), mRNA [NM\_002332]

### a) Gene vor der Bonferroni Korrektur



### b) Gene nach der Bonferroni Korrektur

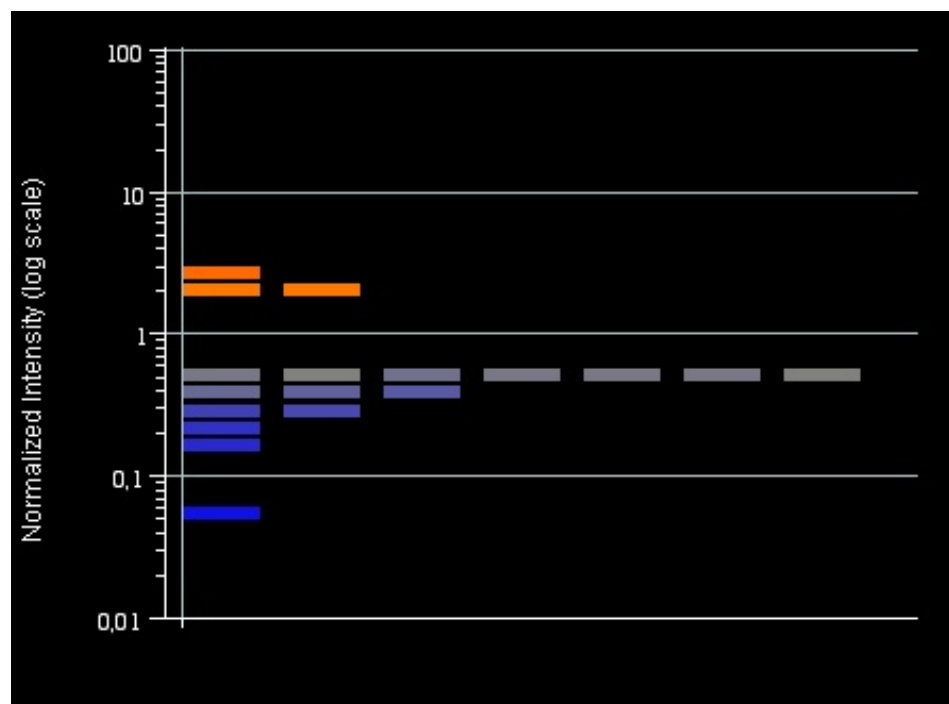


Abbildung 20. siPCNA up- und downregulierte Gene vor und nach der Bonferroni. Korrektur. Darstellung der Intensitätswerte der up- und downregulierten Gene vor a) und nach b) dem Bonferoni Testverfahren (log-scale). Jeder Farbbalken kennzeichnet ein dereguliertes Gen durch den siPCNA-2 Knockdown. Balken in rot kennzeichnen die upregulierten Gene, während die blauen Balken die downregulierten Gene darstellen.

**Tabelle 7. Signifikant deregulierten Gene nach Bonferroni Korrektur.**

NM_004346	↓ 1,91E-05	Homo sapiens caspase 3, apoptosis-related cysteine protease (CASP3), transcript variant alpha, mRNA [NM_004346]
NM_024094	↓ 1,67E-05	Homo sapiens defective in sister chromatid cohesion homolog 1 (S. cerevisiae) (DCC1), mRNA [NM_024094]
NM_138764	↓ 7,82E-06	Homo sapiens BCL2-associated X protein (BAX), transcript variant epsilon, mRNA [NM_138764]
NM_017785	↓ 4,77E-06	Homo sapiens hypothetical protein FLJ20364 (FLJ20364), mRNA [NM_017785]
NM_003686	↓ 4,17E-06	Homo sapiens exonuclease 1 (EXO1), transcript variant 3, mRNA [NM_003686]
NM_014109	↓ 2,43E-06	Homo sapiens ATPase family, AAA domain containing 2 (ATAD2), mRNA [NM_014109]
NM_138578	↑ 1,96E-06	Homo sapiens BCL2-like 1 (BCL2L1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA [NM_138578]
NM_002332	↑ 3,24E-07	Homo sapiens low density lipoprotein-related protein 1 (alpha-2-macroglobulin receptor) (LRP1), mRNA [NM_002332]
NM_003219	↓ 2,65E-07	Homo sapiens telomerase reverse transcriptase (TERT), transcript variant 1, mRNA [NM_003219]
NM_000484	↓ 2,07E-07	Homo sapiens amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease) (APP), transcript variant 1, mRNA [NM_000484]
NM_000930	↓ 2,65E-08	Homo sapiens plasminogen activator, tissue (PLAT), transcript variant 1, mRNA [NM_000930]
NM_002133	↑ 2,47E-08	Homo sapiens heme oxygenase (decycling) 1 (HMOX1), mRNA [NM_002133]
NM_002982	↓ 1,06E-08	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), mRNA [NM_002982]
NM_018132	↓ 4,83E-09	Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 139 (C6orf139), mRNA [NM_018132]
NM_000576	↓ 4,15E-09	Homo sapiens interleukin 1, beta (IL1B), mRNA [NM_000576]
NM_002592	↓ 7,79E-12	Homo sapiens proliferating cell nuclear antigen (PCNA), transcript variant 1, mRNA [NM_002592]

---

## Diskussion

### 4.1 Signaling Pathways im malignen pleuralen Mesotheliom

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht Unterschiede in den Schaltmechanismen die zur Aktivierung von Signaling Pathways im malignen pleuralen Mesotheliom (MPM) beitragen, aufzuklären. Ein spezieller Fokus wurde dabei auf mögliche Unterschiede in den LTS und STS gerichtet. Durch die Generierung eines innovativen Softwareprogramms, war es möglich die Proteinexpression zwischen LTS und STS anhand der Korrelationsunterschiede zu ermitteln.

Die Diskussion aller 37 untersuchten Proteine am TMA würde den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen, daher wird in den folgenden Diskussionspunkte nur auf jene Gruppenunterschiede eingegangen, die eine kausale Beziehung zu bekannten Signaling Pathways erlauben. Diese Unterschiede weisen auf Veränderungen in den regulatorischen Schaltmechanismen innerhalb der Tumorzelle hin. Durch die Analyse beider Gruppen hat sich gezeigt, dass die Mesotheliomzellen die Proliferation (vermittelt durch EGFR oder PDGFR), die Angiogenese (vermittelt durch TIE2) und die Anti-Apoptose (vermittelt durch STAT1, Survivin) in den LTS und STS unterschiedlich regulieren, und dadurch die Überlebensrate der untersuchten Patienten signifikant beeinflusst haben. Eine schematische Darstellung der Signalmechanismen im MPM ist in Abb.21 dargestellt.

#### 4.1.1 Epidermal Growth Faktor Rezeptor (EGFR) Signaling in den LTS

Der Großteil der MPMs zeigt eine Überexpression von EGFR. In den LTS ist der EGFR sehr stark mit den downstream agierenden Effektormolekülen STAT3, den Proto-Onkogenen, c-Fos und c-Jun, und dem PCNA Protein assoziiert. Weitere mit EGFR hoch korrelierte downstream Proteine bei den LTS, nicht jedoch bei den STS, sind die GAB1, Janus Kinase 1 (JAK1; hat außerdem eine Schlüsselrolle bei der Phosphorylierung von STAT3), Extrazelluläre Signal-regulierende Kinase 2 (ERK 2), pAKT und pELK. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Zellsurvival in den LTS vorzugsweise durch EGFR vorangetrieben wird. ERK, AKT und STAT3 sind Teil der EGFR-Signaltransduktionskaskade wie auch c-Fos, c-Jun und PCNA [41, 42].



---

In mehreren klinischen Studie wurden Versuche unternommen den EGFR Signaling Pathway mit den spezifischen EGFR Inhibitoren Gefitinib und Erlontinib zu blockieren, diese Blockade zeigte bei den untersuchten MPM Patienten kaum oder nur einen geringen Effekt. [43-45]. Nur eine Minorität der Patienten profitierte von der EGFR Blockade. Der Grund warum EGFR als Target nur für eine Minorität in Betracht kommt, konnte nicht geklärt werden. Die Autoren der Studien kamen jedoch zum Schluss, dass EGFR als therapeutisches Target bzw. die Blockade von EGFR alleine nicht ausreichend ist, und forderten Kombinationen von Inhibitoren, um einen wirklichen Effekt für die Patienten zu erzielen. Basierend auf unsere Untersuchungsergebnisse vermuten wir, dass diese Patienten-Minorität, bei denen die EGFR Blockade einen Effekt hatte, zu den LTS gehören, weil innerhalb dieser Gruppe der EGFR Signaling Pathway stärker aktiviert ist als in der STS Gruppe und die LTS etwa 10% der Patienten darstellen.

Gestützt wird diese Vermutung einerseits durch die signifikant höhere Expression von TGF- $\beta$  in den LTS und andererseits, durch den positiven Einfluss von TGF- $\beta$  auf das EGFR Signaling. Es ist bekannt das TGF- $\beta$  einen positiven Einfluss auf EGFR ausübt. TGF- $\beta$  induziert die Expression der EGFR-Liganden TGF- $\alpha$  und Heparin-Binding EGF-like Wachstumsfaktor und aktiviert dadurch indirekt den EGFR Pathway.[46]. Diese Liganden bilden Dimere aus und nach erfolgter Rezeptorbindung wird der EGFR aktiviert und die downstream Signalkaskade gestartet. Verglichen mit den STS könnte TGF- $\beta$  aufgrund seines höheren Expressionswertes in den LTS ( $p=0,02$  Abb.10), deshalb für die verstärkte Aktivierung des EGFR Pathway in den LTS verantwortlich sein. Weiters korreliert TGF- $\beta$  auch sehr stark mit PCNA und IGF1. Letzterer ist in den LTS deutlich stärker exprimiert ( $p=0,003$ , Abb.10).

#### **4.1.2 PDGFR Signaling in STS**

Non-Neoplastische (Normale) Mesothelialzellen exprimieren hauptsächlich die PDGFR- $\alpha$  Untereinheit und weniger die PDGFR- $\beta$  Untereinheit, während die malignen Mesotheliomzellen hauptsächlich PDGFR- $\beta$  exprimieren [47]. In unseren Mesotheliomfällen konnten wir beide Untereinheiten, PDGFR- $\alpha$  und PDGFR- $\beta$ , in äquivalenter Expressionshöhe nachweisen. Die Expression von PDGFR- $\alpha$  in den MPM,

---

könnte über Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) angeschaltet werden. Morelli et al. zeigte in seiner Arbeit, dass es in INF- $\gamma$  stimulierten THP1 Zellen zur PDGFR- $\alpha$  Überexpression kommt. Weiters haben sie herausgefunden, dass diese PDGFR- $\alpha$  Überexpression durch eine transiente Bindung des INF- $\gamma$  Proteins an den Promotor von STAT1 [48] induziert wird. In diesem Kontext soll nicht unerwähnt bleiben, das INF- $\gamma$  seinerseits dafür bekannt ist eine Überexpression von STAT1 Protein zu induzieren [49]. Jedoch nur in den STS assoziiert PDGFR- $\alpha$  und PDGFR- $\beta$  downstream mit der Glykogensynthase 3 (GSK3), TIE2, c-Fos, Cyclin D1 und PCNA. Einige von diesen downstream agierenden Proteinen (TIE2, c-Fos und PCNA) spielen auch eine Rolle in den LTS, aber im Gegensatz dazu sind TIE2, c-Fos und PCNA mit EGFR assoziiert.

Durch die genaue Analyse der Korrelationsunterschiede hat es sich herausgestellt, das der EGFR- und der PDGFR-Pathway unterschiedlich in beiden Gruppen aktiviert wird. Obwohl in beiden, LTS und STS, die Proteine in vergleichbaren Mengen exprimiert werden, zeigt die Korrelationsanalyse, dass die LTS den EGFR bevorzugen während die STS den PDGFR Signaling Pathway bevorzugen, jedoch mit unterschiedlichen downstream Interaktionspartnern.

PCNA könnte ein Schlüsselprotein in der Proliferation der MPM in STS und LTS sein. Interessanterweise führt die Bindung der Wachstumsfaktoren EGF, PDGF and IGF1 an ihre korrespondierenden Rezeptoren zur Expression und Stabilisation der mRNA von PCNA [50]. Zieht man diesen Aspekt in Betracht implizieren unsere Ergebnisse weiters, dass die Expression von PCNA sowohl von der EGFR und/oder der PDGFR Aktivierung durch ihre Liganden in den LTS und STS profitieren. Die Blockade solcher zentraler Proteine, die in verschiedenen Signalkaskaden interagieren, könnten potentielle Angriffspunkte für weitere translationale Bemühungen beim MPM sein. PCNA als Einzeltarget oder in Kombination mit PDGFR könnte ein solches Target darstellen.

---

#### **4.1.3 Die Rolle von TIE2 in der Angiogenese im MPM**

TIE2/Tek, eine erst kürzlich identifizierte Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die hauptsächlich im vaskulären Endothelium exprimiert wird, treibt die Angiogenese durch die Stimulation der 4 Angiopoetin-Liganden (Ang1-4) voran. Die Expression von TIE2 im MPM wurde bis jetzt noch nicht untersucht, aber an einer Beteiligung von TIE2 bei Tumoren der Brust, Lunge und Leber wurde ausführlich berichtet [51-53]. In den STS fanden wird TIE2 sehr stark assoziiert mit PDGFR- $\alpha$  und PDGFR- $\beta$ . Im Gegensatz zu den LTS, wo TIE2 mit EGFR assoziiert. Dies gibt Grund zur Annahme, dass die Upregulation von TIE2 im MPM die Folge einer hohen PDGFR Expression in den STS und einer EGFR Expression in den LTS ist.

#### **4.1.4 Anti-Apoptose durch Survivin und STAT1 in den STS**

Survivin, ein Mitglied der Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) Familie, ist speziell im erkrankten Gewebe hochreguliert während im es im normalen (gesunden) Gewebe nicht nachgewiesen werden kann [54]. Auch in unseren Fällen war Survivin exklusiv nur im Tumorgewebe nachweisbar, während es im angrenzenden normalen Gewebe nicht exprimiert wurde. Bei den LTS wurde im Vergleich zu den STS eine geringere Expression von Survivin festgestellt. Xia et al. hat in seinen Untersuchungen an Mesotheliom Zelllinien und Gewebeproben eine Überexpression von Survivin beobachtet - und diese auch als Ursache für das schlechte Ansprechen auf Chemotherapie und Bestrahlung benannt.

Survivin korreliert in den STS mit ERK2, STAT1, c-Jun und PCNA. Davon hervorzuheben ist die Verbindung zwischen Survivin und STAT1, diese deutet auf eine neue Rolle von STAT1 als Promotor für die Anti-Apoptose durch die Upregulation von Survivin. In chemotherapie-resistenten Brustkarzinomen wurde gezeigt werden, das Survivin durch STAT3 verstärkt angeschaltet wird. In weiterer Folge zeigten die Autoren auf, dass die direkte Inhibierung von STAT3, eine Down-regulation von Survivin nach sich zieht [55]. Im Gegensatz zu den Brusttumoren geben unsere Untersuchungen einen deutlichen Hinweis darauf, dass in den STS der MPM eine Survivin Upregulation durch STAT1 induziert wird und nicht durch STAT3. Survivin verhindert im Zuge des intrinsischen Apoptose-Pathways die Aktivierung der Caspase 9 [56]. Die verstärkten STAT1-Survivin und PCNA-Survivin Interaktionen deuten darauf

---

hin, dass die Proliferation getriggert und die Apoptose durch die Survivin Expression blockiert wird, während in den LTS Survivin eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

#### **4.1.5 STAT1 und MECP2 - neue Protein in der Pathogenese des MPM**

STAT (Signal Transducer and Activators of Transcription) Proteine sind eine latente im Zytoplasma vorkommende Proteinfamilie bestehend aus 7 Mitgliedern, STAT 1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , STAT2-6. Die prominentesten Vertreter sind STAT1, STAT3 und STAT5. Während STAT3 und STAT5 als die onkogenen STAT's bezeichnet werden, wird dem STAT1 die Eigenschaft eines Tumorsuppressors zugeschrieben [57]. Interessanterweise konnte STAT1 und STAT5 bei den LTS und STS in gleichen Mengen nachgewiesen werden, im Gegensatz zum STAT3 dass signifikant höher in den LTS exprimiert wurde ( $p= 0,03$  Abb.10). Weiters ist STAT3 in den LTS sehr stark mit EGFR korreliert.

Es hat den Anschein, dass im MPM der Tumorsuppressor STAT1 ähnlich einem Onkogen agiert. Die Korrelationsanalyse ergab weiters, dass die Assoziation STAT1 mit Survivin, p27 und Grb2 exklusiv nur bei den STS eine Rolle zu spielen scheint.

Die Assoziation STAT1 Überexpression und längeres Überleben wurde bei Brust, Kopf und Halstumoren, sowie bei hämatologischen Tumoren beschrieben, jedoch kann im Moment das Vorkommen von STAT1 in Tumoren noch nicht geklärt werden [58]. Daß STAT1 auch beim Mesotheliom eine Rolle spielen könnte ist derzeit noch wenig bekannt. Es gibt lediglich eine *in-vitro* Studie von Buard et al, worin eine STAT1 Überexpression in Mesotheliom Zelllinien nach INF- $\gamma$  Behandlung gemessen wurde.

#### **Anti-Apoptose und Therapieresistenz durch STAT1?**

STAT1 scheint Resistenzmechanismen der Tumorzelle zu unterstützen, da eine Beziehung zwischen einer STAT1 Überexpression und Resistenzentwicklung gegen Bestrahlung und Cisplatin- Therapie bei manchen Tumoren beobachtet wurde [59]. Die bekannte Resistenz gegen Therapien mit Cisplatin und/oder Bestrahlung ist auch ein großes Problem bei den MPM. Induziert eine STAT1 Überexpression im MPM die Resistenzentwicklung im MPM? Unsere Daten deuten darauf hin, dass die Achse

---

STAT1-Survivin mit anti-apoptischen und resistenz-assoziierten Mechanismen in enger Verbindung steht, im speziellen bei Patienten mit einer schlechteren Prognose wie eben die STS.

### **Methyl-CpG-binding Protein 2 (MECP2) im MPM**

Die Methylierung von Cytosin in den sog. „CpG-Inseln“ (Dinukleotidfolgen bestehend aus Cytosin und Guanin im Säugetiergenom) beeinflusst die Genexpression, so sind z.B. häufig die CpG-Inseln in Promotoren inaktivierter Gene methyliert. Die physiologische Aufgabe von Methyl-CpG-binding Protein 2 (MECP2) ist es an die methylierten CpG-Inseln im Genom zu binden. MECP2 liegt bei den LTS und STS hoch exprimiert vor. MECP2 ist im Rahmen zellulärer Prozesse neben der DNA-Methylierung auch an der Histon-Deacetylierung beteiligt. Der Einfluss von MECP2 in neoplastisches Wachstum konnte bei einer Vielzahl humaner Tumoren nachgewiesen werden [60].

Bei den STS ist hervorzuheben, dass die Achse MECP2 und IGF1R eine wichtige Verbindung darstellt, aber welche Rolle sie dabei genau spielt, kann im Moment aufgrund der vorliegenden Daten noch nicht erklärt werden. Zum besseren Verständnis wäre es daher sehr wichtig herauszufinden, welche Rolle das MECP2 Protein in den STS bzw. in den Mesotheliomen generell hat. Ähnliches hat auch Gordon et al. in seinen Untersuchungen entdeckt, sie fanden die mRNA von FMR1 (Fragile X Mentale Retardation 1), ein weiteres X-linked Gen, in den MPMs [61]. Die Rolle dieser X-linked Gene, MECP2 und FMR1, im MPM ist völlig unbekannt, aber es gibt Hinweise, dass sie in epigenetische Regulationsmechanismen involviert sind.

Unsere Arbeit gibt neue Einblicke in die regulatorischen Abläufe der Signaling Pathways im MPM, welche durch differentielle Regulation entscheidend das Tumorstadium in LTS und STS beeinflusst. Zusammenfassend, EGFR Signaling ist stärker in den LTS aktiviert, während das PDGFR Signaling in den STS vorherrschend ist. Die Anti-Apoptose in den STS wird durch die Achse STAT1-Survivin up-reguliert, nicht jedoch in den LTS. Wir haben gezeigt das Studien im Rahmen von „Small Scale

---

Proteomics“ durch eine sinnvolle Verknüpfung von Techniken und Methoden, benutzt werden kann um Unterschiede in der Proteinexpression aufzuklären. Mit dieser Arbeit wurde eine Arbeitshypothese generiert, als Basis für weiterführende Arbeiten im Bereich der translationalen Mesotheliomforschung. Durch weiterführende *in-vitro* Studien soll versucht werden, diese multiplen Targeting-Strategien, wie EGFR, PDGFR, TIE2, STAT1 und PCNA, zu evaluieren. Dadurch könnten sich für die betroffenen Patienten neue Behandlungsoptionen für die Behandlung dieses aggressiven Tumors eröffnen.

## **4.2 siRNA-Interferenz**

Die RNA-Interferenz ist eine Methode zur Reduktion spezifischer mRNA Molekülen in der Zelle. Dabei werden kurze dsRNA Moleküle in der Zelle vom RISC-Komplex aufgenommen, entwunden und mit der komplementären mRNA hybridisiert und in weiterer Folge aufgespalten. Die Spaltung der mRNA führt letztendlich zur verminderten Expression des Zielproteins.

Der Erfolg eines siRNA Experimentes ist vor allem abhängig, von der Sequenz der verwendeten siRNAs und der effizienten Aufnahme in die behandelten Zellen. Daher müssen die optimalen Transfektionsbedingungen für jede Zelllinie ausgetestet und optimiert werden, um eine Reproduzierbarkeit der Silencingergebnisse zu gewährleisten.

Zur Bestimmung der besten Transfektionsbedingungen wurden unterschiedliche Parameter wie siRNA-Konzentration, Zelldichte, Konzentration des Transfektionsreagens (Lipofectamin 2000) kombiniert. Der Aufnahme der siPCNA in die Zellen wurde mittels Rhodamin markierten siRNA im Fluoreszenzmikroskop angezeigt, und so die optimalen Bedingungen für die Transfektionen ermittelt (Abb.15).

---

#### **4.2.1 siPCNA Knockdown in Mesotheliomzelllinien**

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ist ein 36 kDa Kofaktor der DNA-Polymerase  $\delta$  und ist mit der DNA-Synthese bzw. Reparatur assoziiert. PCNA wird in der G1- und S-Phase des Zellzyklus synthetisiert und kann aufgrund der langen biologischen Halbwertszeit von bis zu 20 Stunden bis zum Ende der M-Phase nachgewiesen werden [62]. Im Vergleich dazu sind die Zykline der D-Gruppe mit einer Halbwertszeit von unter 30 Minuten sehr labil. Zykline sind wichtige Interaktionspartner von PCNA im Zellzyklus wie in Ab.14 dargestellt.

Die siPCNA führte in den Mesotheliomzelllinien einerseits zu einer 20fachen Erniedrigung der mRNA von PCNA verglichen zu Kontrolle (Non-Silencing siRNA), und andererseits wurde durch den Knockdown auch eine Deregulation weiterer Gene bzw. mRNAs erzielt, die in direkten oder indirekten Kontakt mit PCNA stehen. Die Liste der signifikant deregulierten Gene ist in Tab. 7 dargestellt.

Die Genexpressionsanalyse zeigt, dass Gene die in direkten Kontakt zu PCNA stehen, wie die katalytische Untereinheit des Enzyms Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) und Exonuklease 1 (EXO 1), von einem effizienten PCNA-Knockdown mitbetroffen werden, und dadurch auch ihrer Expression signifikant geschwächt werden.

#### **Humane Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT)**

Die humane Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) ist die katalytische Untereinheit der Telomerase. Ein Enzym das im Zellkern die Endstücke der Chromosomen, die sogenannten Telomere, wieder herstellt. Bei jeder Zellteilung geht ein ca. 100 Nukleotid langes Stück an den Telomeren verloren, die Aufgabe dieses Enzyms besteht darin die repetitiven DNA Sequenzen an den Telomere wieder

---

aufzufüllen. Die Länge der Telomeren beträgt beim Menschen etwa 10 kb und nach etwa 50-100 Zellteilungen, haben die Telomere nur noch eine Länge von 4-6 kb. Danach geht die Zelle in die Ruhephase über und teilt sich nicht mehr. In den meisten normalen somatischen Zellen ist die hTERT inaktiv, jedoch aktiv in Keimzellen, Stammzellen, Immunzellen und entarteten Zellen. Durch eine äußerst aktive hTERT kann sich die Tumorzelle unkontrolliert teilen und im Körper wuchern, während nicht entartete Zellen sich nur einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen unterziehen können (Hayflick-Grenze) [63].

Mittels TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) Assay konnte Dhaene et al die Telomeraseaktivität in über 90 % maligner pleuraler Mesotheliome nachweisen, nicht jedoch in mesothelialen Zellkulturen [64]. Die hTERT Reaktivierung scheint eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese der MPMs zu spielen. Die positive Assoziation zwischen hTERT und PCNA [65] impliziert für das MPM, dass beide, hTERT und PCNA, einer gemeinsamen Regulation unterliegen. Durch den siPCNA Knockdown wurde die Expression und Proteinsynthese von PCNA gehemmt. Die PCNA Hemmung (ca. 85 %, semiquantitativ) führte in den Mesotheliomzelllinien dazu, dass auch die hTERT Expression um den 2-3fachen Wert herabgesetzt wurde.

Der TRAP-Assay ist ein Nachweisverfahren zur quantitativen Bestimmung der Telomeraseaktivität. Dabei wird das Enzym aus Gewebe oder Zellen extrahiert. Dem Enzymextrakt wird ein Substrat, das strukturell ähnlich wie ein Telomer aufgebaut ist, hinzugegeben. Die Telomerase verlängert das Substrat auf die gleiche Weise wie normalerweise die Telomere, je höher die Aktivität, desto stärker die Verlängerung. Das verlängerte Substrat wird dann mittel PCR amplifiziert und quantifiziert [66].

---

## **Humane Exonuclease 1 (hEXO1)**

Die humane Exonuclease 1 ist in der Zelle verantwortlich für Prozesse wie die DNA Miss Match Reparatur, Replikation und Rekombination. Die Lokalisation von hEXO1 ist auf den Zellkern beschränkt. Im Zellkern ist der C-terminale Teil von hEXO1 während der S-Phase des Zellzyklus mit PCNA co-lokalisiert [67]. Diese Co-Lokalisation von hEXO1 und PCNA

deutet darauf hin, dass beide Proteine aktiv am Match Reparatur Prozess teilnehmen und PCNA die Synthese bei der Miss Match Reparatur ausführt [68]. hEXO1 wird hauptsächlich im fetalen Gewebe exprimiert und kann im adulten Gewebe nicht mehr detektiert werden, dieser Umstand deutet darauf das hEXO1 in der Entwicklungsphase eine Rolle zu spielen scheint.

Diesen Studien zufolge haben Tumore, die ein funktionales hEXO1 exprimieren höhere Progressionsraten. Expressionsanalysen festigen diese Spekulationen, da hEXO1 nur im Tumorgewebe und nicht im korrespondierenden Normalgewebe exprimiert wird [69].

Eine Beteiligung von hEXO1 im MPM wurde bisher noch nicht untersucht. Die Ergebnisse von unserem siPCNA Knockdown in den Meotheliomzellen deuten darauf hin, dass hEXO1 und PCNA auch im Mesotheliom assoziiert sind. Durch die Hemmung von PCNA wird hEXO1 um den gleichen Faktor (2-3fache Erniedrigung) wie hTERT herabgesetzt. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass PCNA, hTERT und hEXO1 gemeinsam über einen Kontrollmechanismus reguliert werden, oder PCNA die hTERT und hEXO1 reguliert. Ob und in welcher Höhe hEXO1 auch im Gewebe von MPM exprimiert wird, soll in weiterführenden Arbeiten untersucht werden. Interessant ist auf jeden Fall, das durch die Blockade eines Targets, wie im vorliegenden Fall durch PCNA, zwei für die Kanzerogenese wichtige Interaktionspartner, hTERT und hEXO1, auch geschwächt werden.

---

### 4.3 Ausblicke

Die Resultate der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass das MPM durch eine kontrollierte Deregulation der Proliferation, Angiogenese und Anti-Apoptose sich einen Wachstumsvorteil auf allen Ebenen des zellulären Survivals gesichert hat. Das dürfte auch mit ein Grund sein, warum dieser Tumor therapeutisch als äußerst schwierig einzustufen ist.

Wir haben gezeigt, dass ein aktiver EGFR Pathway für das längere Überleben der Patienten in den LTS und ein aktiver PDGFR Pathway für ein kürzeres Überleben in den STS mitverantwortlich sind. Aber beide gemeinsam die Expression von PCNA induzieren. Somit scheint PCNA im MPM ein Schlüsselprotein darzustellen, weil es auf der einen Seite die Proliferation und Anti-Apoptose unterstützt, und auf der anderen Seite durch die enge Kooperation mit hTERT und hEXO1 auch Einfluss auf Abläufe des Zellzyklus nimmt. Auf den ersten Blick scheint PCNA ein potentielles Target für die Therapie des MPM darzustellen, ist aber aufgrund seiner zellulären Lokalisation im Zellkern mitunter schwierig anzugreifen ist. Derzeit ist noch kein spezifischer Wirkstoff bekannt, um die Aktivität von PCNA einzuschränken bzw. zu blockieren. Aus diesem Grund würde es Sinn machen, multiple Targetingstrategien in der MPM Therapie anzustreben, vor allem deshalb weil das MPM eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren an der Oberfläche exprimiert und dadurch eine entsprechende Anzahl an Angriffspunkte anbietet.

Durch den Vergleich der LTS und STS auf Proteinebene konnten wir zeigen, dass nicht die Proteinmenge Einfluss auf das Überleben nimmt, sondern viel mehr die Wahl der jeweiligen Interaktionspartner die Prognose positiv bzw. negativ beeinflussen kann.

---

## Referenzen

1. *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. World Health Organization Classification of Tumours, ed. E.B. Wiliam D. Travis, H. Konrad Mueller-Hermelink and C+urtis C. Harris. 2004, Lyon: IARC Press.
2. Attanoos, R.L. and A.R. Gibbs, *Pathology of malignant mesothelioma*. *Histopathology*, 1997. **30**(5): p. 403-18.
3. Robinson, B.W. and R.A. Lake, *Advances in malignant mesothelioma*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(15): p. 1591-603.
4. Sugarbaker, D.J., et al., *Resection margins, extrapleural nodal status, and cell type determine postoperative long-term survival in trimodality therapy of malignant pleural mesothelioma: results in 183 patients*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1999. **117**(1): p. 54-63; discussion 63-5.
5. O'Kane, S.L., et al., *Cyclooxygenase-2 expression predicts survival in malignant pleural mesothelioma*. *Eur J Cancer*, 2005. **41**(11): p. 1645-8.
6. Comin, C.E., et al., *KI-67 antigen expression predicts survival and correlates with histologic subtype in the WHO classification of thymic epithelial tumors*. *Int J Surg Pathol*, 2004. **12**(4): p. 395-400.
7. Bongiovanni, M., et al., *p27(kip1) immunoreactivity correlates with long-term survival in pleural malignant mesothelioma*. *Cancer*, 2001. **92**(5): p. 1245-50.
8. Baldi, A., et al., *Prognostic significance of cyclooxygenase-2 (COX-2) and expression of cell cycle inhibitors p21 and p27 in human pleural malignant mesothelioma*. *Thorax*, 2004. **59**(5): p. 428-33.
9. Ismail-Khan, R., et al., *Malignant pleural mesothelioma: a comprehensive review*. *Cancer Control*, 2006. **13**(4): p. 255-63.
10. Zucali, P.A. and G. Giaccone, *Biology and management of malignant pleural mesothelioma*. *Eur J Cancer*, 2006. **42**(16): p. 2706-14.
11. Pott, F., *Animal experiments on biological effects of mineral fibres*. *IARC Sci Publ*, 1980(30): p. 261-72.
12. Lopez-Rios, F., et al., *Evidence against a role for SV40 infection in human mesotheliomas and high risk of false-positive PCR results owing to presence of SV40 sequences in common laboratory plasmids*. *Lancet*, 2004. **364**(9440): p. 1157-66.

- 
13. Baris, Y.I., et al., *An outbreak of pleural mesothelioma and chronic fibrosing pleurisy in the village of Karain/Urgup in Anatolia*. Thorax, 1978. **33**(2): p. 181-92.
  14. Roushdy-Hammady, I., et al., *Genetic-susceptibility factor and malignant mesothelioma in the Cappadocian region of Turkey*. Lancet, 2001. **357**(9254): p. 444-5.
  15. Carbone, M., et al., *A mesothelioma epidemic in Cappadocia: scientific developments and unexpected social outcomes*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(2): p. 147-54.
  16. Robinson, B.W., et al., *Soluble mesothelin-related protein--a blood test for mesothelioma*. Lung Cancer, 2005. **49 Suppl 1**: p. S109-11.
  17. Beyer, H.L., et al., *MESOMARK: a potential test for malignant pleural mesothelioma*. Clin Chem, 2007. **53**(4): p. 666-72.
  18. Park, E.K., et al., *Soluble Mesothelin Related Protein (SMRP) in an Asbestos Exposed Population*. Am J Respir Crit Care Med, 2008.
  19. Ramos-Nino, M.E., et al., *Cellular and molecular parameters of mesothelioma*. J Cell Biochem, 2006. **98**(4): p. 723-34.
  20. Kratzke, R.A., et al., *Immunohistochemical analysis of the p16INK4 cyclin-dependent kinase inhibitor in malignant mesothelioma*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(24): p. 1870-5.
  21. Whitson, B.A. and R.A. Kratzke, *Molecular pathways in malignant pleural mesothelioma*. Cancer Lett, 2006. **239**(2): p. 183-9.
  22. Jagadeeswaran, R., et al., *Functional analysis of c-Met/hepatocyte growth factor pathway in malignant pleural mesothelioma*. Cancer Res, 2006. **66**(1): p. 352-61.
  23. Galateau-Salle, F., *Pathology of Malignant Mesothelioma*. 2006, London: Springer Verlag. 204.
  24. Dorsett, Y. and T. Tuschl, *siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(4): p. 318-29.
  25. McManus, M.T. and P.A. Sharp, *Gene silencing in mammals by small interfering RNAs*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(10): p. 737-47.
  26. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D. D, Smith, J.A., Seidman, J.G. and Struhl, K. , *Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley, Editor. 1998: New York.
  27. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular Cloning* third ed, ed. A.L. Manual. 2001, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- 
28. Lepore, P.D., *FDA's good laboratory practise regulations*. Pharmaceutical Technology, 1979: p. 71-74.
  29. Lindl, T., *Zell- und Gewebe kultur*. 2002, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
  30. Schroeder, A., et al., *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*. BMC Mol Biol, 2006. 7: p. 3.
  31. Laemmli, U., *Cleavage of sturctural proteins during the assembly of the head of bakteriofophage T4*. Nature, 1970(227): p. 680-683.
  32. Gerlach, C., et al., *Ki-67 immunoexpression is a robust marker of proliferative cells in the rat*. Lab Invest, 1997. 77(6): p. 697-8.
  33. Beer, T.W., et al., *Prognosis in malignant mesothelioma related to MIB 1 proliferation index and histological subtype*. Hum Pathol, 1998. 29(3): p. 246-51.
  34. Comin, C.E., et al., *MIB-1 proliferation index correlates with survival in pleural malignant mesothelioma*. Histopathology, 2000. 36(1): p. 26-31.
  35. Ashcroft, S. and C. Pereira, *Practical Statistics for the Biological Sciences*. 2003: PALGRAVE MACMILLAN. 167.
  36. Goeman, J.J., et al., *A global test for groups of genes: testing association with a clinical outcome*. Bioinformatics, 2004. 20(1): p. 93-9.
  37. Kothmaier, H., et al., *EGFR and PDGFR differentially promote growth in malignant epithelioid mesothelioma of short and long term survivors*. Thorax, 2008. 63(4): p. 345-51.
  38. Choi, J.K., et al., *Differential coexpression analysis using microarray data and its application to human cancer*. Bioinformatics, 2005. 21(24): p. 4348-55.
  39. Moldovan, G.L., B. Pfander, and S. Jentsch, *PCNA, the maestro of the replication fork*. Cell, 2007. 129(4): p. 665-79.
  40. Maga, G. and U. Hubscher, *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners*. J Cell Sci, 2003. 116(Pt 15): p. 3051-60.
  41. Mukohara, T., et al., *Therapeutic targeting of multiple signaling pathways in malignant pleural mesothelioma*. Oncology, 2005. 68(4-6): p. 500-10.
  42. Ramos-Nino, M.E., et al., *Human mesothelioma cells exhibit tumor cell-specific differences in phosphatidylinositol 3-kinase/AKT activity that predict the efficacy of Onconase*. Mol Cancer Ther, 2005. 4(5): p. 835-42.
  43. Govindan, R., et al., *Gefitinib in patients with malignant mesothelioma: a phase II study by the Cancer and Leukemia Group B*. Clin Cancer Res, 2005. 11(6): p. 2300-4.
  44. Mathy, A., et al., *Limited efficacy of imatinib mesylate in malignant mesothelioma: a phase II trial*. Lung Cancer, 2005. 50(1): p. 83-6.

- 
45. Garland, L.L., et al., *Phase II study of erlotinib in patients with malignant pleural mesothelioma: a Southwest Oncology Group Study*. J Clin Oncol, 2007. **25**(17): p. 2406-13.
  46. Caja, L., et al., *Differential intracellular signalling induced by TGF-beta in rat adult hepatocytes and hepatoma cells: implications in liver carcinogenesis*. Cell Signal, 2007. **19**(4): p. 683-94.
  47. Ascoli, V., et al., *Platelet-derived growth factor receptor immunoreactivity in mesothelioma and nonneoplastic mesothelial cells in serous effusions*. Acta Cytol, 1995. **39**(4): p. 613-22.
  48. Morelli, P.I., et al., *IFNgamma regulates PDGF-receptor alpha expression in macrophages, THP-1 cells, and arterial smooth muscle cells*. Atherosclerosis, 2006. **184**(1): p. 39-47.
  49. Buard, A., et al., *Human malignant mesothelioma cell growth: activation of janus kinase 2 and signal transducer and activator of transcription 1alpha for inhibition by interferon-gamma*. Cancer Res, 1998. **58**(4): p. 840-7.
  50. Shukla, A., et al., *Multiple roles of oxidants in the pathogenesis of asbestos-induced diseases*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(9): p. 1117-29.
  51. Dales, J.P., et al., *Tie2/Tek expression in breast carcinoma: correlations of immunohistochemical assays and long-term follow-up in a series of 909 patients*. Int J Oncol, 2003. **22**(2): p. 391-7.
  52. Takahama, M., et al., *Enhanced expression of Tie2, its ligand angiopoietin-1, vascular endothelial growth factor, and CD31 in human non-small cell lung carcinomas*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(9): p. 2506-10.
  53. Tanaka, S., et al., *Tie2 vascular endothelial receptor expression and function in hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2002. **35**(4): p. 861-7.
  54. Xia, C., et al., *Induction of apoptosis in mesothelioma cells by antisurvivin oligonucleotides*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(9): p. 687-94.
  55. Diaz, N., et al., *Activation of stat3 in primary tumors from high-risk breast cancer patients is associated with elevated levels of activated SRC and survivin expression*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(1): p. 20-8.
  56. Fennell, D.A. and R.M. Rudd, *Defective core-apoptosis signalling in diffuse malignant pleural mesothelioma: opportunities for effective drug development*. Lancet Oncol, 2004. **5**(6): p. 354-62.
  57. Stephanou, A. and D.S. Latchman, *Opposing actions of STAT-1 and STAT-3*. Growth Factors, 2005. **23**(3): p. 177-82.
  58. Buettner, R., L.B. Mora, and R. Jove, *Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(4): p. 945-54.

- 
59. Klampfer, L., *Signal transducers and activators of transcription (STATs): Novel targets of chemopreventive and chemotherapeutic drugs*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2006. **6**(2): p. 107-21.
60. Prokhortchouk, E. and B. Hendrich, *Methyl-CpG binding proteins and cancer: are MeCpGs more important than MBDs?* *Oncogene*, 2002. **21**(35): p. 5394-9.
61. Gordon, G.J., et al., *Identification of novel candidate oncogenes and tumor suppressors in malignant pleural mesothelioma using large-scale transcriptional profiling*. *Am J Pathol*, 2005. **166**(6): p. 1827-40.
62. Woods, A.L., et al., *The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G2+M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis*. *Histopathology*, 1991. **19**(1): p. 21-7.
63. Shay, J.W. and W.E. Wright, *Hallmarks of telomeres in ageing research*. *J Pathol*, 2007. **211**(2): p. 114-23.
64. Dhaene, K., et al., *Expression profile of telomerase subunits in human pleural mesothelioma*. *J Pathol*, 2000. **190**(1): p. 80-5.
65. Gao, D.X., et al., *[Expression of telomerase and telomerase associated-regulation protein and proliferating cell nuclear antigen in ovarian epithelial tumors]*. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 2003. **32**(4): p. 319-22.
66. Kim, N.W. and F. Wu, *Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP)*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(13): p. 2595-7.
67. Nielsen, F.C., et al., *Characterization of human exonuclease 1 in complex with mismatch repair proteins, subcellular localization and association with PCNA*. *Oncogene*, 2004. **23**(7): p. 1457-68.
68. Gu, L., et al., *ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair*. *Nucleic Acids Res*, 1998. **26**(5): p. 1173-8.
69. Rasmussen, L.J., et al., *Identification of factors interacting with hMSH2 in the fetal liver utilizing the yeast two-hybrid system. In vivo interaction through the C-terminal domains of hEXO1 and hMSH2 and comparative expression analysis*. *Mutat Res*, 2000. **460**(1): p. 41-52.

---

# Anhang

## I. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1. Das pleurale Mesotheliom. Schematische Darstellung einer gesunden Pleura und einem pleuralen Mesotheliom (www.cancerresearchuk.org).</b>	<b>1</b>
<b>Abbildung 2. Weltweite epidemiologische Entwicklungen des malignen Mesothelioms [3].</b>	<b>3</b>
<b>Abbildung 3. Asbestfasern. Die Asbestfasern a) Krokydolith zur Gruppe der Amphibolen gehörend und b) Chrysotyl zur Gruppe der Serpentine im Rasterelektronenmikroskop.</b>	<b>5</b>
<b>Abbildung 4. Hypothetische Häufigkeitsverteilung der Karzinogenität von Asbestfasern, in Abhängigkeit von Länge und Durchmesser (nach Pott [11]). Asbestfasern mit einer Länge von ~20µm und einem Durchmesser ~0,2µm besitzen ein hohes krebserzeugendes Potential.</b>	<b>6</b>
<b>Abbildung 5. Erionit und das Dorf Karain in der Region Cappadocia [15].</b>	<b>8</b>
<b>Abbildung 6. Signaling Pathways im MPM. Schematische Darstellung der Pathway Aktivierung durch Asbestfasern an der Zelloberfläche, die zur Bildung von Wachstumsfaktoren und zur Initialisierung der Survivalmechanismen beitragen [19].</b>	<b>12</b>
<b>Abbildung 7. Mechanismus der RNAi.</b>	<b>16</b>
<b>Abbildung 8. Die Extraktion der RNA und Proteine aus den Zelllysaten im Überblick (PARIST<sup>TM</sup> Handbuch, Ambion).</b>	<b>37</b>
<b>Abbildung 9. Workflow der durchgeführten Genexpressions Analyse mit dem Agilent Whole Genome Array.</b>	<b>39</b>
<b>Abbildung 10. Darstellung der Proteinexpressions-Profile in LTS und STS am TMA. Die Proteinexpression in der LTS (orange Box-Plots) und STS (gelbe Box-Plots) Gruppe, welche durch die korrespondierenden Antikörper am TMA detektiert wurde, sind graphisch durch Whisker-Box-Plots dargestellt. Der daraus resultierende Produkt Score wurde nach <math>\log_2(x+20)</math> transformiert und ist auf der horizontalen Achse dargestellt. Auf der vertikalen Achse sind die Proteine/Antikörper entsprechend ihrer Signifikanz (<math>p &lt; 0,05</math>) aus dem Vergleich der Mittelwerte für beide Gruppen gelistet. Die p-Werte wurden durch den Vergleich der Mittelwerte ausgehend vom Produkt Score nach Wilcoxon Rank Sum Test ermittelt.</b>	<b>52</b>
<b>Abbildung 11. Whisker-Box-Plot.</b>	<b>53</b>
<b>Abbildung 12. Netzwerk, graphische Darstellung der signifikanten Korrelationen/Korrelationsdifferenzen in den LTS und STS MPM-Patienten. Ein sogenanntes Netzwerk besteht aus Knoten und Kanten. Die Knoten (nodes) repräsentieren die Antikörper bzw. die Proteine die durch diese Antikörper detektiert werden, während die Kanten (Linien) die Beziehung (Korrelation) zwischen den Knoten anzeigen. Zwischen den Antikörpern bestehen 666 Korrelationsmöglichkeiten, in der Graphik sind nur Korrelationen <math>&gt; 0,7</math> angezeigt. Die blauen Linien zeigen die Korrelation innerhalb der long-term Survivors (LTS) und die Linien in rot die Korrelationen in den short-term Survivors und die schwarzen Linien zeigen die Korrelationsdifferenzen zwischen LTS und STS (<math>p &lt; 0,05</math>) an.</b>	<b>57</b>
<b>Abbildung 13. Immunhistochemische Färbungen am Mesotheliom TMA. Abb. 13a zeigt einzelne Mesotheliomgewebe-Stanzen am TMA für EGFR, PDGFR-<math>\alpha</math>, PDGFR-<math>\beta</math>, TIE2, c-Fos und c-Jun.</b>	<b>58</b>
<b>Abbildung 14: Zelluläre Interaktionen und Interaktionspartner von PCNA im Zellzyklus [40].</b>	<b>62</b>
<b>Abbildung 15. Effizienzüberprüfung der siPCNA in den Mesotheliomzelllinien. Die Zellen CRL-5915 und MSTO-221H wurden mit Rhodamin markierter siRNA transfiziert. 2 h nach der Transfektion mit Lipofectamine<sup>TM</sup> (Invitrogen) wurde die Transfektionseffizienz mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops bestimmt. Die Rhodamin markierte siRNA, die von den Zellen ins Zytoplasma aufgenommen wurde erscheint rot, die DAPI gefärbten Zellkerne erscheinen blau. Die siRNA in der Zelle ist in ansteigender Konzentration (a-d) abgebildet.</b>	<b>64</b>
<b>Abbildung 16. siPCNA Knockdown Western Blot Analyse. Die Proteinextrakte, 20 µg Totalprotein, wurden über ein 12prozentiges SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF Membran transferiert. Auf dem Western Blot sind die vier verschiedenen siRNA Sequenzen gegen PCNA (Spur 1-4), Positivkontrolle, (Spur 5), Negativkontrolle (Spur 6) und Wachstumskontrolle (Spur 7). Nach einer Detektionszeit von 1min kann auf Höhe von 36 kDa ein deutliches Signal festgestellt werden (a). siPCNA-2 (Spur 2) zeigt eine deutliche Reduktion der Proteinexpression von PCNA im Vergleich zu den siPCNA 1, 3, 4 Sequenzen (Spur 1, 3 und 4) sowie zu den Kontrollen. PCNA Antikörper (PC 10; Dako M879); Sekundäntikörper: Polyclonal Rabbit Anti-Mouse IgG HRP-conjugated (Dako; P0260). ECL-Detektion: RPN2106 (Amersham). Die Ladekontrolle <math>\beta</math>-Actin ist</b>	

in b) dargestellt. $\beta$ -Actin Antikörper 42 kDa (AC 15 Sigma-Aldrich). S: Protein ladder (Fermentas #SM0661) 1: siRNA PCNA-1; 2: siRNA PCNA-2; 3: siRNA PCNA-3; 4: siRNA PCNA-4; 5: Positivkontrolle (Lamin A/C); 6: Negativkontrolle (mit gleichen Konz. Lipofectamine 2000); 7: Wachstumskontrolle (ohne siRNA und Lipofectamine).	65
<b>Abbildung 17. siPCNA-2 Knockdown in CRL-5915 und MST0-211H.</b> Die Proteinextrakte der behandelten Zelllinien, 20 $\mu$ g Totalprotein, wurden über ein 12prozentiges SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF Membran transferiert. Auf dem Western Blot ist nur die siRNA Sequenz gegen PCNA-2 (Spur 1, 4), Positivkontrolle, (Spur 2, 5), und Wachstumskontrolle (Spur 3, 6). ). Nach einer Detektionszeit von 1min kann deutliches Signal festgestellt werden. (a). siPCNA-2 (Spur 2) zeigt eine deutliche Reduktion der Proteinexpression von PCNA im Vergleich zu den Kontrollen. PCNA Antikörper (PC 10; Dako M879); Sekundärantikörper: Polyclonal Rabbit Anti-Mouse IgG HRP-conjugated (Dako; P0260). ECL-Detektion: RPN2106 (Amersham). Ladekontrolle $\beta$ -Actin ist in Abb. b) dargestellt. $\beta$ -Actin Antikörper 42 kDa (AC 15 Sigma-Aldrich).	66
<b>Abbildung 18. Qualitäts Reports der Hybridisierung.</b>	68
<b>Abbildung 19. Darstellung der Gene nach der Normalisierung.</b> a) zeigt die Gene, die innerhalb von Fold change +2 und -2 liegen, nicht in die Analyse einbezogen; b) zeigt die Gene die außerhalb vom fold change +2 / -2 liegen, diese wurden für die weiteren Analysen verwendet.	86
<b>Abbildung 20. siPCNA up- und downregulierte Gene vor und nach der Bonferoni. Korrektur.</b> Darstellung der Intensitätswerte der up- und downregulierten Gene vor a) und nach b) dem Bonferoni Testverfahren (log-scale). Jeder Farbbalken kennzeichnet ein dereguliertes Gen durch den siPCNA-2 Knockdown. Balken in rot kennzeichnen die upregulierten Gene, während die blauen Balken die downregulierten Gene darstellen.	96
<b>Abbildung 21. Schematische Darstellung der unterschiedlichen Interaktionen von EGFR und PDGFR Signaling in LTS und LTS im malignen pleuralen Mesotheliom [37].</b> Die Proteine markiert in grau wurden am Tissue Microarray untersucht, während die Proteine in weiß dargestellt nicht untersucht wurden. Pfeile zeigen eine Aktivierung an, P steht für Phosphorylierung. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die Schlüsselproteine innerhalb der diskutierten Pathways dargestellt.	99

## II. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1. Antikörperliste.</b> Die verwendeten Antikörper und deren Applikation am TMA. Die 37 Antikörper sind in alphabetischer Reihenfolge gelistet mit Angabe über Verdünnung Antigenretrival, Detektionsverfahren und Hersteller. Die Antikörper wurden entsprechend den Angaben der jeweiligen Hersteller verwendet und ausgetestet.	19
<b>Tabelle 2. Humane Mesotheliomzelllinien.</b>	30
<b>Tabelle 3. Bestandteile und Konzentration des verwendeten Kulturmediums.</b>	30
<b>Tabelle 4. Klinische Charakterisierung der 48 epitheloiden MPM Patienten am TMA.</b> Taken 36 months as cut-off level for survival 26 patients were identified as LTS and 22 as STS. Der MIB-1/Ki-67 Proliferation Index (< 30 % oder > 30 %) korreliert mit dem Überleben der Patienten in der STS und LTS Gruppe.	51
<b>Tabelle 5. Korrelationsdifferenzen in der STS und LTS Gruppe.</b> Die resultierenden signifikanten Korrelationsdifferenzen ( $p < 0,05$ ) zwischen der STS und der LTS Gruppe sind entsprechend ihrer Differenz entweder auf der linken (STS Gruppe) oder rechten Seite (LTS Gruppe) der Tabelle dargestellt.	55
<b>Tabelle 6. Signifikant deregulierte Gen nach siPCNA-2 Knockdown in Mesotheliomzelllinien (vor dem Bonferoni Test).</b>	87
<b>Tabelle 7. Signifikant deregulierten Gene nach Bonferoni Korrektur.</b>	97

---

### III. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
cRNA	komplementäre RNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
h	Stunden
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
LTS	Long-term Survivors
MPM	Maligne pleurale Mesotheliom
N-terminal	aminoterminal
PBS	Phosphat buffer saline
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	Small-inhibitory RNA
STS	Short-term survivors
TMA	Tissue Microarray
RNAi	RNA-Interferenz
TBS	Tris buffer saline