

Aus dem Institut für Virologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**RNA binding motif protein 4 (RBM4) a/b Proteinexpression in humanen
Leberzellkarzinomen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von Patrick Hoffmann

geb. am: 28.06.1985 in Esslingen am Neckar

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	7
1. Einleitung / Fragestellung	8
1.1. Fragestellung und Ziele der Arbeit	8
1.2. Das RNA binding motif protein 4 – RBM4	9
1.2.1. Entdeckung	9
1.2.2. Struktur und Genlocus	10
1.2.3. Expression und Funktion	12
1.3. Das Leberzellkarzinom	15
1.3.1. Epidemiologie, Risikofaktoren	15
1.3.2. Pathologie und molekulargenetische Veränderungen	16
1.3.2.1. Pathogenese von Leberzellkarzinomen	16
1.3.2.2. Genetische Veränderungen	18
2. Material	21
2.1. Chemikalien, Membranen	21
2.2. Puffer und Lösungen	22
2.3. Geräte, Behälter	23
2.4. Proteine	24
2.4.1. Größenmarker	24
2.5. Antikörper & Vektoren	24
2.5.1. Primärantikörper	24
2.5.2. Sekundärantikörper	25
2.5.3. Expressionsvektoren	25
2.5.3.1. pSG5	25
2.6. Zellstämme	26
2.7. Computersoftware	26
3. Methoden	27
3.1. Erstellen von Proteinextrakten	27
3.1.1. Extrakte aus humanen HCC-Proben	27
3.1.2. Extrakte aus transfizierten HuH-7-Zellen	27

3.2.	Messung von relativen Proteingehaltsänderungen	28
3.2.1.	SDS-PAGE	28
3.2.1.1.	Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels	29
3.2.1.2.	Durchführung einer SDS-PA-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) ...	29
3.2.2.	Western-Blot.....	30
3.2.3.	Detektion durch Immunfärbung.....	31
3.3.	Eukaryotische Zellkultur	33
3.3.1.	Kultur von HuH7-Lyon-Zellen	33
3.3.2.	Zellzählung (CASY)	33
3.3.3.	Transfektion von Huh7-Zellen mit Nanofectin.....	34
4.	Ergebnisse	35
4.2.	Western-Blots	36
4.3.	Quantifizierung und Auswertung.....	38
4.3.1.	RBM4b-Erniedrigung im Tumorgewebe.....	40
4.3.2.	Veränderung des RBM4a Gehalts	42
4.3.3.	Zusammenhang der Proteingehaltsänderungen.....	43
5.	Diskussion	46
5.1.	Gewinnung und Aufarbeitung der Probenpaare von HCC-Patienten ..	46
5.2.	Quantifizierung der Proben per Haushaltsgen	47
5.3.	HCC spezifische Mutationen als Ursache für RBM4-Abfall?	48
5.4.	RBM4 als Regulator im KRAS-Pathway	48
5.5.	Beeinflussung von kritischen Zellzyklusgenen wie p53.....	49
6.	Literaturverzeichnis.....	51
7.	Appendix	59
8.	Publikationen	63
9.	Danksagung	64
10.	Eidesstattliche Erklärung.....	65

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aminosäuresequenz von RBM4a /b	10
Abbildung 2: Genlocus von RBM4 auf Chromosom 11q13 (nach Lai 2003, Suppl.).	11
Abbildung 3: Die Stadien der (hepatischen) Kanzerogenese	18
Abbildung 4: Chromosomale Aktivität von HCC-assoziierten Genen	19
Abbildung 5: Aufbau des PSG5 Expressionsvektors	26
Abbildung 6: Blot nach PonceauS-Färbung (s/w Kopie)	31
Abbildung 7: Prinzip der verbesserten Chemilumineszenz.....	32
Abbildung 8: PonceauS-Färbung der Aufbereitungschargen im Vergleich	36
Abbildung 9: Western-Blot der Lark-A-Messreihe.....	37
Abbildung 10: Exemplarische Darstellung der Proteinquantifizierung	38
Abbildung 11: relative Änderung von RBM4 a/b im Tumorgewebe	40
Abbildung 12: Korrelation von Tumorgröße / Tumorstadium zur RBM4b-Änderung.	41
Abbildung 13: Rbm4b-Änderung vs. Tumorentität.....	42
Abbildung 14: RBM4a vs. Tumorgröße /-entität.....	43
Abbildung 15: RBM4a- vs. RBM4b-Änderung	44
Abbildung 16: Huh7-Transfektion (exemplarisch).....	45

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inzidenz des Leberzellkarzinoms nach IARC 2012.....	15
Tabelle 2: Primärantikörper	25
Tabelle 3: Rezept für 10%iges SDS-PA-Gel.....	29
Tabelle 4: Liste der verwendeten Probenpaare	35
Tabelle 5: relative Änderung RBM4a/b von Normal- zu Tumorgewebe.....	39
Tabelle 6: Quantifizierung Transfektionsversuch.....	45

IV Abkürzungen

α -TM	α -Tropomyosin
AA	Acrylamid
AFP	alpha-Fetoprotein
Ago	Argonaute (-Proteinkomplex)
AS	Aminosäure
ASR	age-standardised rates per 100,000
BIS-AA	Bisacrylamid
CAD	C-terminale Alanin-reiche Domäne
CCC	cholangio-zelluläres Karzinom
CCHC-Zinkfinger	Cystein-Cystein-Histidin-Cystein-Zinkfinger
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPC3	Glypican 3
HBx	Hepatitis-B-Virus-Protein-X
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HbsAg	Hepatitis B Serum Antigen
HepB	Hepatitis B
HepC	Hepatitis C
HGF	hepatocyte growth factor
HIF1a	hypoxia-inducible factor-1a
IARC	International Agency for Research on Cancer
IGF-2	insulinlike growth factor 2
KI	Konfidenzintervall
LMW	low molecular weight Proteingrößenstandart
mRNA	messenger RNA
miRNA	micro RNA
N	Normalgewebe
PAA	Polyacrylamid
PTB	polypyrimidine tract binding protein
rA	relative Änderung
RB	retinoblastoma gene
RBM	RNA binding motif protein

RBM4	RNA binding motif protein 4
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RRMs	RNA recognition motifs
s	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sk α -TM	skeletal muscle specific α -tropomyosin
sm α -TM	smooth muscle specific α -tropomyosin
SR-Proteine	Serin-Arginin-reiche-Proteine
T	Tumorgewebe
TGF-alpha/-beta	transforming growth factor alpha bzw. beta
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TRN-SR2	Transportin-SR2 (ein β -Importin-Protein)
WT1	Wilms Tumor Protein 1

Zusammenfassung

RBM4a/b Proteinexpression in humanen Leberzellkarzinomen

Das RNA-binding-motif-protein-4 (RBM4) ist ein Protein aus der Familie der SR-Proteine und ist an posttranskriptionellen Prozessen wie alternativem Splicing und Exonselektion beteiligt. RBM4b, eine Isoform des Proteins, wird hochspezifisch in Leber- und Nierenzellen exprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass der relative Gehalt an RBM4b in Leberzellkarzinomen im Vergleich zu gesundem Gewebe aus derselben Leber signifikant erniedrigt ist. Zwar tritt diese Veränderung in allen hepatozellulären Karzinomen auf, scheint aber in Tumoren cholangiozellulären Ursprungs deutlich stärker ausgeprägt zu sein. Die Veränderung des RBM4a-Gehalts folgt bei den vergleichenden Experimenten keinem bestimmten Muster. Außerdem wurde durch Transfektion von Huh7-Zellen die gegenseitige Beeinflussung der Expression beider Proteinvarianten ausgeschlossen.

Abstract

RBM4a/b protein expression in human hepatocellular carcinoma

The RNA-binding-motif-protein-4 (RBM4) is a member of the SR-protein family. It is involved in post-transcriptional processes including alternative splicing and exon selection. RBM4b, an isoform of this protein, is expressed specifically in both the liver and the kidney. In this study we were able to show that the relative amount of RBM4b is significantly reduced in liver cell carcinoma as compared to healthy tissue from the same patient. Although this decrease occurs in every hepatocellular carcinoma examined, it seems to be much more pronounced in tumor cells of cholangiocellular origin. The change of the RBM4a level did not follow any regular pattern. Moreover, a reciprocal influence of the two protein isoforms on each other's expression was excluded by transfection experiments employing Huh7-cells.

1. Einleitung / Fragestellung

1.1. Fragestellung und Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die relative Expression der beiden Varianten des RNA-binding-motiv-protein-4 (RBM)4a bzw. RBM4b im normalen Lebergewebe im Vergleich zum Leberzellkarzinom zu bestimmen.

Für diese Arbeit wurden Proben aus Normal- (N) und Tumorgewebe (T) von denselben Patienten entnommen und vergleichend auf Ihren RBM4-Spiegel geprüft. Vornehmliches Ziel war es, die Vermutung zu untermauern, dass RBM4b in hepatischem Tumorgewebe konsequent erniedrigt sei. Ferner sollte überprüft werden, ob die Überexpression einer der beiden Proteinvarianten die Expression der jeweils anderen beeinflusst. Dazu wurden Transfektionsversuche in Huh-7 Zellen durchgeführt.

Im Rahmen der Arbeit von Herrn Dr. Thorsten Pfuhl zur Expression von RBM4a in einzelnen Teilen des Gehirns (Pfuhl et al. 2008) aus dem Institut für Virologie der Universitätsklinik des Saarlandes zeigte sich erstmals eine hochspezifische Expression von RBM4b ausschließlich in Leber und Niere. Versuche mit karzinomatös veränderten bzw. immortalisierten Leberzelllinien wiesen damals massiv erniedrigtes (Alex-3), kein (Huh-7) oder ein offensichtlich mutiertes (Hep-G2) RBM4b auf. Zwar ist die biologische Funktion von RBM4b noch weitgehend ungeklärt, dennoch ist Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit zu RBM4a anzunehmen, dass auch RBM4b eine bedeutende Rolle im posttranskriptionellen Processing spielt (s. Einleitung zu RBM4).

1.2. Das RNA binding motif protein 4 – RBM4

1.2.1. Entdeckung

Mit der Entdeckung der Serin-Arginin-reichen (SR-)Proteine Anfang der 90er Jahre (Roth et al. 1990; Zahler et al. 1992) wurde die molekularbiologische Forschung auf dem Gebiet der an posttranskriptionellen Prozessen und Exonselektion beteiligten Proteine intensiviert. Nicht zuletzt weil bekannt wurde, welche bedeutende Rolle die Interaktion mit RNA, alternatives Splicing und Exonselektion in der Entwicklung von Krankheiten haben (Caceres et al. 2002). So wurde das „LARK“-Protein in *Drosophila melanogaster* als ein wichtiger Faktor für die (negativ) regulatorische Steuerung der Embryonalentwicklung während der Verpuppung identifiziert (Newby et al. 1993). Das „RNA binding motif protein 4“ (RBM4) wurde durch Jackson et al. (1997) als Äquivalent zum *Drosophila* LARK im Säugetier erstmalig beschrieben (Jackson et al. 1997). Nach der Entdeckung spezifischer Transportmechanismen für RNA und entsprechend assoziierte Splicingfaktoren im Zellkern (Nakielny et al. 1999) begann durch Lai und Mitarbeiter (2003) die genauere Untersuchung von RBM4 als Substrat des Transportin-Serin-Arginin-2 (TRN-SR2)-Transporters (Lai et al. 2003).

1.2.2. Struktur und Genlocus

RBM4 ist ein 365 (RBM4a) bzw. 360 (RBM4b) Aminosäuren (AS) langes und ca. 40 kDa schweres Protein. Die beiden Proteine weisen eine hohe Ähnlichkeit auf (Jackson et al. 1997; Lai et al. 2003; Markus et al. 2006). Zur Differenzierung wurden Antikörper gegen den größtmöglichen, unterschiedlichen Sequenzabschnitt bei AS 255–269 verwendet (Pfuhl et al. 2008), siehe Abb.1.

RBM4a	1	MVKLFIGNLPREATEQEIRSLFEQYGVLECDIIKNYGFV
RBM4b	1	MVKLFIGNLPREATEQEIRSLFEQYGVLECDIIKNYGFV
RBM4a	41	HIEDKTAATEDAIRNLHHYKLHGVNINVEASKNKSKTSTKL
RBM4b	41	HIEDKTAATEDAIRNLHHYKLHGVNINVEASKNKSKASTKL
RBM4a	81	HVGNISPTCTNKELRAKFEYGPVIECDIVKDYAFVHMER
RBM4b	81	HVGNISPTCTNQELRAKFEYGPVIECDIVKDYAFVHMER
RBM4a	121	AEDAVEAIRGLDNTEFQGKRMHVQLSTSRLRTAPGMDQS
RBM4b	121	AEDAVEAIRGLDNTEFQGKRMHVQLSTSRLRTAPGMDQS
RBM4a	161	GCYRCGKEGHSKECPIDRSGRVADLTEQYNEQYGAVRTP
RBM4b	161	GCYRCGKEGHSKECPVDRTGRVADFTEQYNEQYGAVRTP
RBM4a	201	YTMSYGDSLYYNNAYGALDAYYKRCRAARSYEAVTAAAA-
RBM4b	201	YTMGYGESMYNDAYGALD-YYKRYRV-RS YEAVAAAAAA
RBM4a	240	SVYNYAEQTLSQLPQVQNTAMASHLTSTSLDPYDRHLLPT
RBM4b	239	SAYNYAEQTMSHLPQVQSTTVTSHLNSTSLDPYDRHLLPN
RBM4a	280	SGAAATAAAAAAAAAAVTAASTSYGRDRSPLRRATAPVP
RBM4b	279	SGAAATSAAMAAAAA---TTS-SYGRDRSPLRRAAAML
RBM4a	320	TVGEGYGYGHESELSQASAAAARNSLYDMARYEREQYADRA
RBM4b	315	TVGEGYGYGPESELSQASAATRNSLYDMARYEREQYVDRA
RBM4a	360	RYSAF
RBM4b	355	RYSAF

Abbildung 1: Aminosäuresequenz von RBM4a /b

(modifiziert nach Lai et al 2003)

Grau hinterlegt sind identische Aminosäuren, rot markiert ist der Angriffspunkt des RBM4b spezifischen Antikörpers 1B2

Die strukturelle Homologie des Säuger-RBM4 im Vergleich zum *Drosophila* LARK beträgt 69% auf Proteinebene, wobei lediglich 49% identische Basen auf DNA Ebene vorliegen. Das Gen für RBM4a/b liegt auf Chromosom 11q13. Das Gen für RBM4a befindet sich komplett innerhalb des zweiten Introns von RBM4b. Dies deutet evolutionär auf eine Entwicklung durch Genduplikation hin (Lai et al. 2003).

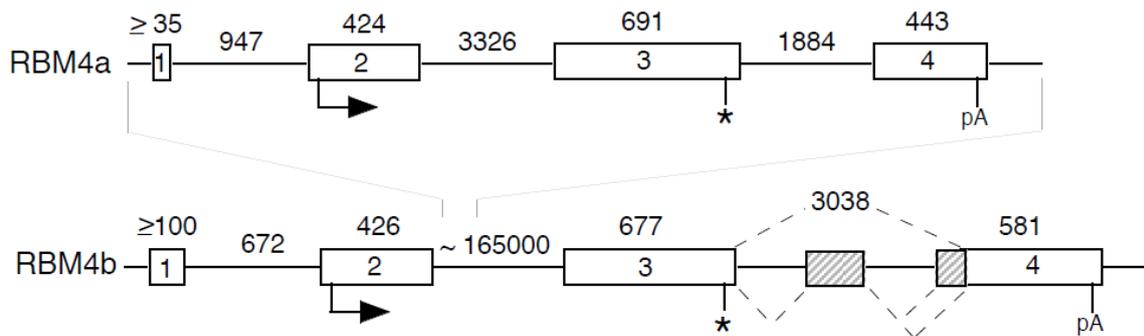


Abbildung 2: Genlocus von RBM4 auf Chromosom 11q13 (nach Lai 2003, Suppl.)

Der Genlocus von RBM4a liegt innerhalb des 2. Introns von RBM4b. Exons sind als nummerierte Rechtecke, Introns als gerade Linie dazwischen dargestellt. Der Pfeil markiert das Start-, Sternchen das Stopp-Codon. „pA“ verweist auf den Beginn des Polyadenylierungssignals.

RBM4a/b weisen am N'-terminalen Ende zwei sog. „RNA recognition motifs“ (RRMs) und einen CCHC-Zinkfinger auf (Jackson et al. 1997). Am C'-terminalen Ende findet man beim Säugetier-RBM4 drei Alanin-reiche Abschnitte. Genau diese C-terminalen Alanin-reichen Domänen (CAD's) und N-terminalen RRM's sind für die Funktion des Proteins unabdingbar (Funktion und Quellen im folgenden Abschnitt 1.2.3 „Expression und Funktion“). Für den CHCC-Zinkfinger ist bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Funktion bekannt (Markus et al. 2009).

1.2.3. Expression und Funktion

Während RBM4a weitgehend ubiquitär exprimiert wird und seine größten Konzentrationen an Protein in Hoden, Ovarien, Herz, Pankreas und vor allem Skelettmuskel und Leber aufweist (Lin et al. 2005; Kojima et al. 2007), wird RBM4b-Protein spezifisch in Leber und Niere nachgewiesen (Pfuhl et al. 2008). Bei genauer Untersuchung der intrazellulären Aufenthaltsorte von RBM4 (genaue Untersuchungen liegen nur zu RBM4a vor – „RBM4“ bezieht sich auf diese Studien) fällt eine Kolo-kalisation mit SR-Proteinen im Zellkern auf. Dies lässt eine funktionelle Ähnlichkeit mit SR-Proteinen vermuten. Sie weisen außerdem strukturelle Ähnlichkeiten auf: sowohl SR-Proteine, wie auch RBM4, haben N'-terminale, RNA-bindende Domänen. Die C'-terminalen Domänen zur Interaktion mit Proteinen sind die Serin-reiche-Region (SR) beim SR-Protein und die CAD bei RBM4 (Graveley 2000; Markus, Morris 2009). SR-Proteine beeinflussen das pre-mRNA Splicing durch das Binden von Splicingfaktoren (Manley et al. 1996; Graveley 2000), durch die 3'-Splicesite-Selektion (Lavigne et al. 1993), die 5'-Splicesite Selektion (Ryner et al. 1996) und Exon-unabhängige Funktionen (Graveley 2000). Es ist also nicht verwunderlich, dass auch RBM4 eine Rolle beim alternativen Splicing von mRNA spielt. So kann RBM4 durch alternierende 5'-Splicesite-Selektion bestimmte Exons entweder transkribieren oder ausschließen (Lai et al. 2003; Lin, Tarn 2005; Markus, Morris 2006). Dabei unterdrückt RBM4 interessanter Weise die Funktion der endogenen SR-Proteine (Lai et al. 2003). Ein Beispiel dafür ist die Fähigkeit von RBM4, als Antagonist zum PTB (polypyrimidine tract binding protein), die Synthese von α -Tropomyosin (α -TM) in Muskelzellen zu regulieren. So wird durch RBM4 die Expression von skelettmuskel-spezifischem α -TM (sk α -TM) gesteigert, die Expression von für glatte Muskulatur spezifischem α -TM (sm α -TM) bleibt dagegen weitgehend unbeeinflusst (Lin, Tarn 2005). Da sich diese beiden α -TM Isoformen durch den selektiven Einschluss von Exon 2 und 9 (entspricht sk α -TM) unterscheiden (Ruiz-Opazo et al. 1985), untermauert das die Fähigkeit von RBM4 zur spezifischen Exonselektion. Ferner interagiert RBM4 mit der 5'-Splicesite von Exon 10 des tau-Proteins, einem wichtigen Faktor für die ordnungsgemäße Funktion von Nervenzellen im Gehirn, wo stets ein strenges Gleichgewicht an +Exon10 und

–Exon10 Isoformen herrschen muss. Ein zu hoher RBM4-Spiegel resultiert in erhöhter Produktion der +Exon10-tau-Variante, was letztendlich durch zelluläre Ablagerungen des Proteins das Auftreten von Tauopathien wie z. Bsp. Morbus Alzheimer begünstigt. Es wurde durch Mutationsversuche gezeigt, dass die N-terminalen RRM kritisch für diese Exon-selektierende Funktion des RBM4 sind (Kar et al. 2006). Auch für die C-terminale CAD des RBM4 sind wichtige funktionelle Eigenschaften bekannt. So etwa die Interaktion mit dem Wilm's Tumor Protein 1 (WT1) und der Import in den Zellkern via TRN-SR2-Transporter. Das WT1 tritt nicht nur im gleichnamigen Nierenzelltumor auf, sondern wurde auch bei anderen Tumorentitäten, wie etwa beim Prostatakarzinom (Dechsukhum et al. 2000) und akuten Leukämien (Pritchard-Jones et al. 1997) nachgewiesen. Bei Brustkrebs und hepatozellulärem Leberkarzinom (HCC) wurde es sogar als eigenständiger, die Prognose maßgeblich verschlechternder, Stagingfaktor beurteilt (Miyoshi et al. 2002; Sera et al. 2008). WT1 interagiert mit RBM4 und inhibiert dessen Funktionen beim alternativen Splicing. Durch Versuche mit Deletionsmutanten wurde gezeigt, dass die CAD absolut notwendig für die Bindung an WT1 ist. RRM und CHCC-Zinkfinger spielen bei der Interaktion mit WT1 keine Rolle (Markus et al. 2006). Auch bei der Interaktion mit dem TRN-SR2(-Transporter) ist die CAD die funktionskritische Domäne. In einem „yeast two-hybrid assay“ konnte eine direkte Interaktion von RBM4 mit einem Transportin-SR2 (TRN-SR2) bait gezeigt werden (Lai et al. 2003). Das TRN-SR2 ist ein Protein aus der Familie der β -Importine (Lai et al. 2000), die Interaktion ermöglicht einen Import in den Zellkern (Nakielny, Dreyfuss 1999). Dennoch kann RBM4, wie auch die SR-Proteine (Caceres et al. 1998), frei zwischen Zellkern und Zytoplasma transportiert werden, es ist in perinukleären „speckles“ wie auch im Zytoplasma zu finden (Lai et al. 2003; Lin, Tarn 2005). Der Transport ins Zytoplasma wird vor allem durch Phosphorylierung des RBM4 an Serin-309 vermittelt (Lin et al. 2007). Diese intrazelluläre Verschiebung durch Phosphorylierung ist auch bei SR-Proteinen nachgewiesen (Misteli et al. 1998). Der Phosphorylierungsprozess wird z. Bsp. durch Zellstress induziert (Lin et al. 2007) und wirkt paradox auf die Funktion: RBM4 hemmt nun die 5'-Cap vermittelte Translation im Zytoplasma, gleichzeitig wirkt es als Enhancer für die Translation von stressassoziierten Proteinen, die in das endoplasmatische Retikulum transloziert werden (Lin et al. 2007; Lin et al. 2009).

Die Familie der Argonaute-Proteine (AGO) spielt eine essentielle Rolle bei der durch microRNA (miRNA) bzw. small interfering RNA (siRNA) vermittelten Genregulation. AGO-Komplexe können die Translation von Proteinen inhibieren und sind auch endonukleär beim „gene-silencing“ aktiv (Beitzinger et al. 2007; Peters et al. 2007; Pillai et al. 2007). RBM4 ist ein fester Bestandteil des „AGO2-Complex III“ (AGO2-III). Dort führt es zu einer verbesserten Bindungsfähigkeit des AGO-Komplexes an miRNA vermittelten Zielstrukturen. Ebenso wurde für AGO2-III-RBM4 die Bindung an der 3'-UTR des „Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog“ (KRAS) und die Interaktion mit miR-19b nachgewiesen (Hock et al. 2007). RBM4 ist somit ein wichtiger Bestandteil von AGO-vermittelter Gen-Regulation.

1.3. Das Leberzellkarzinom

1.3.1. Epidemiologie, Risikofaktoren

Das hepatozelluläre Leberkarzinom (HCC) ist eine gehäuft bei Männern auftretende Tumorerkrankung. Weltweit werden jährlich über 750.000 Neuerkrankungen bekannt, wobei diese bei Männern ungefähr 4mal häufiger auftreten als bei Frauen. Die Gesamtinzidenz des HCC weltweit beläuft sich auf 5,9% aller Tumorentitäten, bei Männern belegt das HCC mit 7,9% Platz 5 in der Gesamthäufigkeit aller Tumorerkrankungen (Ferlay et al. 2010). Mit einer Inzidenz von 4-6 Neuerkrankungen per 100.000 Einwohner pro Jahr (oder: 4-6 „age-standardised-rate“, ASR) ist es in den westlichen Industrieländern zwar eher selten (Ferlay et al. 2010), in Endemiegebieten wie der Mongolei (94,4 ASR), dem subsaharischen Afrika (Nigeria 9,9 bis Gambia 36,1 ASR), Thailand (29,7 ASR), Vietnam (29,3 ASR) und China (25,7 ASR) treten jedoch deutlich höhere Inzidenzen auf. In Gebieten mit zusätzlich starker Hepatitis B/C (HepB, HepC) Durchseuchung wird in älteren Studien von bis zu 150 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr berichtet (Rustgi 1987).

Tabelle 1: Inzidenz des Leberzellkarzinoms nach IARC 2012

POPULATION	ASR
Mongolia	94.4
The Gambia	36.1
Chinese Taipei	35.7
Thailand	29.7
Vietnam	29.3
China	25.7
Congo, Democratic Republic of	18.8
Ghana	17.4
Guinea-Bissau	16.7
Senegal	16.4
Sierra Leone	15.8
Nigeria	9.9
Western Europe	4.4
Northern America	4.4

basierend auf den Daten der GLOBOCAN Studien 2008. Quelle: <http://globocan.iarc.fr/>

Man geht davon aus, dass in China, Korea und Südafrika 85 – 95% der HCC Patienten Hepatitis-B-Serum-Antigen (HbsAg) positiv sind (Rustgi 1987; El-Serag 2012). Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung der Hepatitis als unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten eines HCCs. Auch der in den Endemiegebieten um ca. 20 Jahre niedrigere Altersgipfel des Erstauftretens zeigt, dass eine längere Exposition mit Hepatitisviren B/C in Kombination mit chronischer Entzündung und die dadurch verbundene, immunogene Zerstörung des Lebergewebes die Inzidenz des HCC maßgeblich erhöht (Kew et al. 1982; Zaman et al. 1985; Tanaka et al. 2011; El-Serag 2012). Das Auftreten einer Leberzirrhose, egal ob auf Basis einer HBV/HCV-Infektion oder aufgrund chronischen Alkoholkonsums, führt zu einer deutlich höheren HCC-Inzidenz (Beasley 1988). Auch Alkoholkonsum per se erhöht das Risiko an einem HCC zu erkranken, ebenso wie Rauchen und das Vorhandensein einer diabetischen Stoffwechselerkrankung (Jee et al. 2004). Diabetes mellitus ist aktuellen Metaanalysen zufolge sogar als eigenständiger Risikofaktor zu bewerten (Wang et al. 2012). Neue Fallstudien weisen außerdem auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem chronischen Gebrauch von Anabolika und dem Auftreten eines HCC hin (Gorayski et al. 2008).

1.3.2. Pathologie und molekulargenetische Veränderungen

1.3.2.1. Pathogenese von Leberzellkarzinomen

Die sogenannten „ovalen Zellen“ bilden die Basis des potentiell sehr regenerativen Lebergewebes. Sie gehen aus den „lining cells“ der Hering’schen Kanäle (terminale Gallengänge) hervor und sind multipotent. Sie können sich zu Hepatozyten, Gallengangzellen und auch Pankreaszellen differenzieren (Evarts et al. 1987; Braun et al. 1989; Lemire et al. 1991; Shiojiri et al. 1991). Durch diese Multipotenz und die damit verbundenen, sensiblen Differenzierungsmechanismen sind ovale Zellen allerdings auch potentielle Vorläuferzellen für Lebertumore (Sell et al. 1982; Hixson et al. 1990). Ein erhöhter Umsatz an ovalen Zellen wurde mit frühen Stadien der hepatischen Kanzerogenese in Verbindung gebracht (Braun et al. 1989). Dieser erhöhte Umsatz wird vor allem durch die Exposition mit kanzerogenen und lebertoxischen Stoffen (z.Bsp. Aflatoxin B1, HBV-X-Protein (HBx), Alkohol, Nikotin,

Medikamente, Kontrastmittel) ausgelöst (Saeter et al. 1990) und geht mit der erhöhten Synthese von Wachstumsfaktoren, wie z.Bsp. transforming growth factor (TGF-alpha / -beta), insulinlike growth factor II (IGF-II) und hepatocyte growth factor (HGF) einher (Evarts et al. 1992; Hu et al. 1993).

Die Entstehung eines Leberkarzinoms lässt sich allgemein in 3 Abschnitte einteilen (Dragan et al. 1992): Initiation – Promotion – Progression.

Im Stadium der Initiation erfolgt das erste Auftreten einer irreversiblen genetischen Veränderung. Diese Veränderung kann entweder spontan oder durch die Exposition mit kanzerogenen Noxen induziert sein. Genetische Disposition z.Bsp. durch das Vorhandensein einer Hämochromatose (Powell et al. 1996), eines Morbus Wilson (Berman 1988) oder eines α 1-Antitrypsinmangels (Elzouki 1999) begünstigt die Tumorentstehung. Während die spontan auftretenden Ereignisse durch Überführung der ovalen Zelle in die Apoptose reversibel sind (Grasl-Kraupp et al. 1994), führen durch kanzerogene Noxen ausgelöste Veränderungen immer zu einem direkten Übergang in das Stadium der Promotion (Dominguez-Malagon et al. 2001).

Das Stadium der Promotion zeichnet sich durch die Klonierung der genetisch irreversibel veränderten Krebsvorläuferzellen im gesunden Lebergewebe aus. Auch dieser Schritt ist prinzipiell noch reversibel (Solt et al. 1980). Kommt es allerdings zu einer fortlaufenden Exposition mit kanzerogenen Agenzien (den sog. „Promotoren“), besteht die Chance, dass sich die Krebsvorläuferzellen zu Tumorzellen entwickeln. Studien belegen, dass die konsequente Exposition mit Promotoren über einen möglichst langen Zeitraum für diesen Schritt im Promotionsstadium essentiell wichtig ist (Hendrich et al. 1986; Laconi et al. 1993).

Im letzten Stadium, der Progression, erfolgt durch weitere genetische Veränderungen die Aktivierung von Onkogenen bzw. die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Hsu et al. 1991; Pitot 1993). Dadurch verändern sich kleine Subpopulationen (1-5%) zu manifesten, malignen Leberzellkarzinomzellen (Pitot et al. 1991).

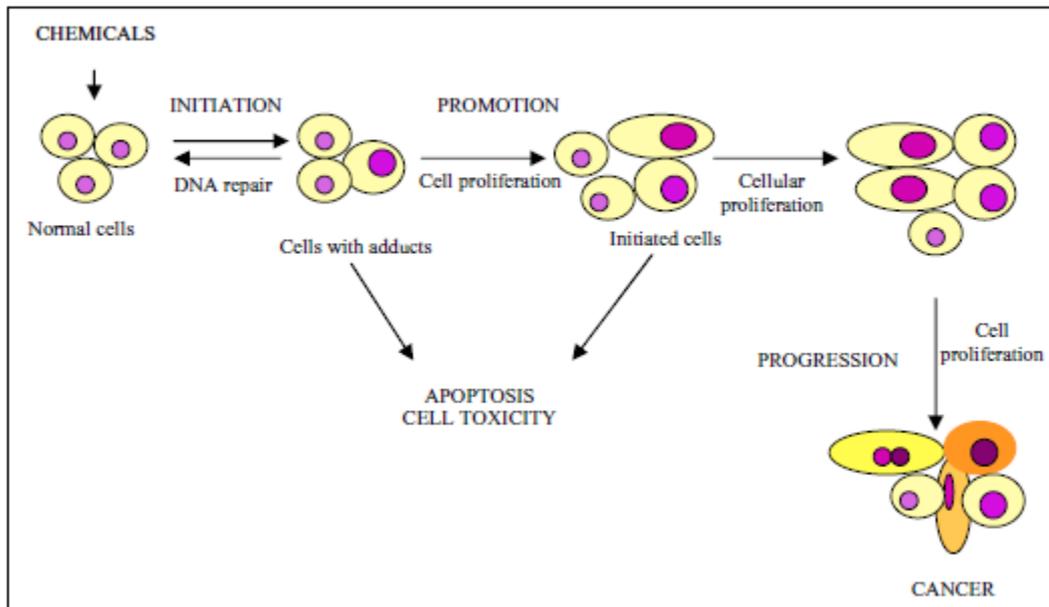


Abbildung 3: Die Stadien der (hepatischen) Kanzerogenese

(Oliveira et al. 2007)

Grafische Darstellung der elementaren Schritte der Kanzerogenese angelehnt an Dragan et al. 1992

1.3.2.2. Genetische Veränderungen

Die kritischen genetischen Veränderungen bei der Entwicklung eines HCC entstehen vor allem an Tumorsuppressorgenen wie p53 oder dem retinoblastoma gene (RB) (Hsu et al. 1991; Murakami et al. 1991). Das p53 Gen wird durch im Zellzyklus auftretende DNA-Schäden aktiviert. Durch direkte Interaktion des p53 mit der DNA bzw. Transkriptionsaktivierung werden Gene induziert, die entweder zur Arretierung im Zellzyklus oder zur Apoptose führen (Kern et al. 1992). Vor allem Aflatoxin B1 führt hochspezifisch durch eine Depurination an der 3te Base im Codon 249 des p53 Gens zu dessen Funktionsverlust (Aguilar et al. 1993). Das HBx-Protein, eine nach der Integration von HBV DNA synthetisierte Serin-Threonin-Kinase, interagiert ebenfalls mit p53 und trägt so zur hepatogenen Kanzerogenese bei (Andrisani et al. 1999). HBx fungiert außerdem als Transkriptionsaktivator, moduliert die intrazelluläre Signaltransduktion und beeinflusst die Zellproliferation/Apoptose. Die am besten untersuchte Funktion des HBx ist seine Fähigkeit zur Hochregulation von zelleigenen, aber auch viralen Genen (Spandau et al. 1988). Dabei bindet das HBx allerdings nicht direkt DNA, sondern greift über Phosphorylierung, mRNA-Stabilisierung und Modulation von Zellkerntransportern in die intrazellulären

Proteinaktivitäten ein (Yeh 2000).

Normalerweise führt die Integration von HBV-DNA in das Hepatozytengenom nur zu kleinen Mikrodeletionen (Nakamura et al. 1988), aber auch großflächige Deletionen am Chromosom 11p13 – 11p14 bzw. 13q und damit verbundener Verlust von potenziell wichtigen Genen wurden beobachtet (Wang et al. 1988). Diese wurden mit einer Progression zum manifesten HCC in Verbindung gebracht, sind aber nicht pathognomisch (Rogler et al. 1985).

Die Deletionen spiegeln sich auch in Studien zu hochregulierten Genen in HCCs wieder. Patil et al. haben in Ihrer großangelegten Studie die Häufigkeit des Auftretens spezifischer DNA-Kopien für im HCC hochexprimierte Gene in den einzelnen Chromosomen gemessen (Patil et al. 2005). Dabei zeigte sich im Vergleich zur durchschnittlichen Kopienzahl in gesunden Leberzellen eine deutliche Aktivitätsabnahme u.a. in den Chromosomen 11 und 13q. Die Chromosomen 1q, 6p, 8q und 20, welche typischerweise in HCC hochregulierte Genloci beinhalten, zeigen eine deutlich erhöhte Aktivität.

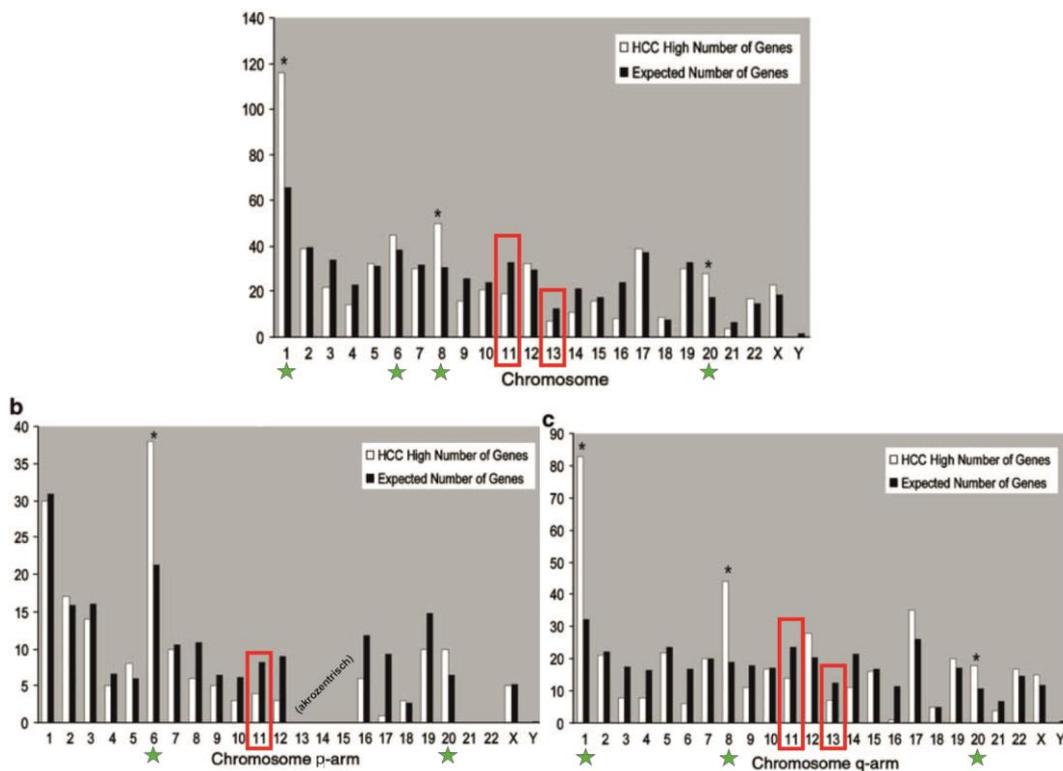


Abbildung 4: Chromosomale Aktivität von HCC-assoziierten Genen

(aus Patil et al. 2005, modifiziert)

Oben Aktivität auf dem ganzen Chromosom, unten Aktivität auf dem kurzen p-Arm (b) bzw. dem langen q-Arm (c). Rot markiert die in toto deregulierten Chromosomen, welche im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen. Der grüne Stern markiert die Chromosom(abschnitt)e mit stark erhöhter Aktivität.

Die Motivation von Patil et al. für ihre Suche nach in HCCs hochexprimierten Genen begründete sich unter anderem auf der Tatsache, dass der populärste Screeningparameter – das alpha-Fetoprotein (AFP) – vor allem bei frühen Stadien des HCC nur eine geringe Spezifität aufweist (Nguyen et al. 2002). Trotzdem wurde AFP mit einer mittleren Erhöhung um das ca. 62-fache als wichtigstes, sekretorisches und im HCC überexprimiertes Gen bestätigt, dicht gefolgt von einem leberspezifischen Glykoprotein, dem Glypican 3 (GPC3) (Patil et al. 2005). GPC3 ist ein membranständiges Proteoglycan und spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose (Liu et al. 2012).

Alle weiteren hochregulierten Gene wurden in spezifische Kategorien eingeteilt. Dabei fallen die meisten Gene in Gruppen für den Zellhaushalt, das Zellwachstum und den Proteinmetabolismus. Auf molekularer Ebene gehen die Produkte dieser Gene hauptsächlich folgenden Aufgaben nach: Bindung an DNA, RNA oder Transkriptionsfaktoren und katalytische Aktivität. Diese Gengruppen und ihre Funktionsmechanismen sind als evident wichtig für die Entstehung eines HCCs einzustufen (Patil et al. 2005). Gene der RBM Gruppe tauchen in dieser Studie zwar auf (RBM7 – 1,67x Erhöhung und RBM3 – 1,56x Erhöhung), weisen aber im Vergleich zu anderen Genen eine relativ geringe Erhöhung auf.

2. Material

2.1. Chemikalien, Membranen

Acrylamid	Serva
Agarose	Invitrogen
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare
Amidoschwarz	Sigma
Bisacrylamid	Serva
Bromphenolblau	Serva
CASYton	Innovatis
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
EDTA	Serva
Ethanol	Roth
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories
Glycin	Serva
H ₂ O ₂	Sigma
Isopropanol	Roth
Magermilchpulver	Töpfer
3-Mercapto-1,2-propandiol	Sigma
Nanofectin	PAA Laboratories
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Nitrocellulosemembran Protran	Schleicher & Schuell
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
PonceauS	Sigma
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	ADEFO-CHEMIE
Röntgen-Fixierer-Konzentrat	ADEFO-CHEMIE
Trishydroxamethyl-aminomethan (Tris)	Serva
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories
Zellulosefilter (Whatman)	Herolab

Alle weiteren, hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden über die Firma Roth (Karlsruhe) in analysereiner Form bezogen.

2.2. Puffer und Lösungen

Amidoschwarz-Färbelösung	:	Isopropanol	25,0% (v/v)
		Essigsäure	10,0% (v/v)
		Amidoschwarz	0,1% (w/v)
Bottom-stock (Trenngel)	:	Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
		SDS	0,4% (w/v)
ECL-Lösung A	:	Luminol in DMSO	250 mM
ECL-Lösung B	:	p-Coumarsäure in DMSO	90 mM
ECL-Lösung C	:	Tris HCL (pH 8,5)	1 M
ECL-Lösungs-Mix	:	Lösung A	2,5 ml
		Lösung B	1,13 ml
		Lösung C	2 ml
		ad 250 ml H ₂ O	
Entfärber-Lösung	:	Isopropanol	10% (v/v)
		Essigsäure	10% (v/v)
PBS	:	NaCl	140 mM
		KCl	25 mM
		MgCl ₂	0,5 mM
		CaCl ₂	1 mM
		Na-K-Phosphat	10 mM

PBS-Milch	:	Magermilchpulver in PBS	5% (w/v)
PonceauS-Färbelösung	:	PonceauS Essigsäure	0,1% (w/v) 5% (v/v)
2x Sample-Buffer	:	Tris HCL (pH6,8) SDS 3-Mercapto-1,2propandiol Glycerol Bromphenolblau	130 mM 6% (w/v) 10% (v/v) 10% (w/v) 0,05% (w/v)
SDS-Laufpuffer	:	Tris/HCl SDS Glycin	0,025 M 0,1% (w/v) 0,2 M
Transferpuffer	:	Tris/HCl Glycin Methanol SDS	25 mM 192 mM 20% (v/v) 0,05% (w/v)
Up-stock (Sammelgel)	:	Tris-HCl pH 6,8 SDS	0,5 M 0,4% (w/v)

2.3. Geräte, Behälter

Blotkammer	Transphor Elektrophoresis Unit, Hocter TE
Photometer	NanoDrop 2000c, PEQLAB
Photometer	Ultrospec 3100pro, Amersham Biosciences
Scanner	LiDE 70, Canon

Spannungsquelle	PHERO-Stab. 300, BT-Fischer
Ultraschallgerät	SONIFIER 250, Branson
Zellkulturflasche 25cm ²	50ml, red-cap, greiner bio-one
Zellkulturflasche 75cm ²	red-cap, SARSTEDT
Zellkulturschale	100x20mm, steril, greiner bio-one
Zellzähler	CASY-Counter, Schade

2.4. Proteine

2.4.1. Größenmarker

Zur Bestimmung der Molekülgröße bei der SDS-PAGE wurde ein hauseigener Mehrkomponentenmarker verwendet. Er eignet sich hervorragend für die Anwendung in 10%igen PAA-Gelen und erlaubt gemäß seiner Bestandteile eine ausreichend präzise Größenschätzung im Bereich von 14,4 – 94 kDa.

LMW = „low molecular weight“ – Marker:

Phosphorylase b	94	kDa	0,5 mg/ml
Kälberserumalbumin	67	kDa	0,7 mg/ml
Ovalbumin	43	kDa	1 mg/ml
Carboanhydrase	30	kDa	0,5 mg/ml
Trypsininhibitor (Sojabohne)	20,1	kDa	1 mg/ml
Lactalbumin	14,4	kDa	0,5 mg/ml

2.5. Antikörper & Vektoren

2.5.1. Primärantikörper

Verwendet wurden durch Frau Dr. Elisabeth Kremmer (GSF, München) erstellte, monoklonale (α -Ratte-)Antikörper. Darüber hinaus wurde zum Zwecke der

Quantifizierung ein gegen das Housekeeping-Gene GAPDH gerichteter (α -Kaninchen-)Antikörper eingesetzt.

Tabelle 2: Primärantikörper

Bezeichnung	Epitop	Typ	Konzentration
6G7	RBM4a	α -Ratte	1:5
1B2	RBM4b	α -Ratte	1:5
6E10	RBM4a+b	α -Ratte	1:5
14C10	GAPDH	α -Kaninchen	1:1000

2.5.2. Sekundärantikörper

Es wurden mit Meerrettichperoxidase gekoppelte Sekundärantikörper der Firma Sigma verwendet. (α -Rat-Pox, 1:5000; α -Rabbit-Pox, 1:5000)

2.5.3. Expressionsvektoren

2.5.3.1. pSG5

Der pSG5-Vektor (s. Abbildung 5) ist ein sog. „high-copy-number“ Plasmid der mit Hilfe eines SV40-Promotors, eines anschließenden β -Globulin-Introns und eines den Expressionsrahmen abschließendes SV40-Polyadenylierungssignals als Expressionsvektor in eukaryotischen Zellen eingesetzt wird. An der „multiple cloning site“ des Vektors kann mit Hilfe der Restriktionsstellen EcoR I, BamH I oder Bgl II das gewünschte Expressionsprodukt einkloniert werden. Ein „ampicillin“-Abschnitt bringt ein Gen für Ampicillinresistenz mit sich, wodurch sich bei der Vermehrung des Vektors im prokaryoten System die Vektorträger selektieren lassen.

The pSG5 Vector

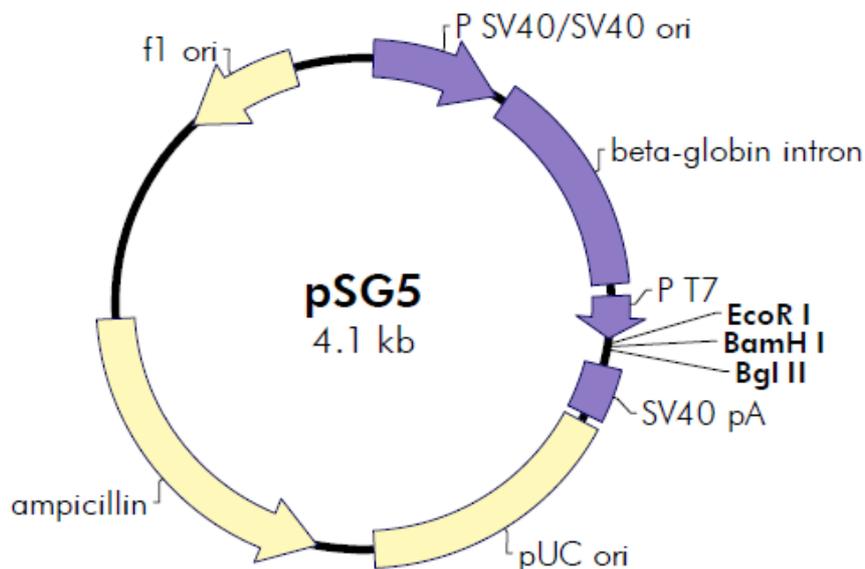


Abbildung 5: Aufbau des PSG5 Expressionsvektors

(Quelle: Stratagene PSG5 User Manual)

2.6. Zellstämme

2.6.1. HuH7-Lyon Zelllinie

Die HuH7-Zelllinie (CelluloNet, Lyon, France) weist sehr wenig bis gar keine endogene Expression von RBM4b auf (Pfuhl et al. 2008). Sie wurde 1982 aus dem HCC eines 57-jährigen Japaners gewonnen (Nakabayashi et al. 1982) und für diese Arbeit aufgrund der Ähnlichkeit zu den Originalproben ausgewählt.

2.7. Computersoftware

Canon ScanGear 12.1 (Canon Soft)	Einscannen der Western Blots
CorelDraw X5 (Corel Corporation)	Grafiken, Abbildungen
Excel 2010 (Microsoft)	Tabellarische Auswertung der Messwerte

Quantity One (BioRad)	quantitative Auswertung der Western Blots
Sigma Plot 10.0 (Systat Software)	statistische Auswertung und Schaubilder
Word 2010 (Microsoft)	Textverarbeitung

3. Methoden

3.1. Erstellen von Proteinextrakten

3.1.1. Extrakte aus humanen HCC-Proben

Die von Herrn Prof. Dr. Otto Kollmar (Klinik für Allgemeinchirurgie im Universitätsklinikum Homburg) zur Verfügung gestellten, intraoperativ gewonnenen Präparate wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und wie folgt aufgearbeitet: Begonnen wurde mit der mechanischen Zerkleinerung der in Alufolie einwickelten Präparate. Anschließend wurden die Bruchstücke in ein 15 ml Probengefäß überführt und mit 500 µl 2x Sample Buffer versetzt. Die Zellen wurden dann für 3 x 10s mit dem Ultraschallstab aufgeschlossen und danach für 5 Minuten im Wasserbad gekocht. Die nun denaturierten und in 2x-Sample-Buffer gelösten Extrakte wurden im letzten Schritt bei 14000 U/min, 4°C über 5 min zentrifugiert, um eventuell zurückgebliebene Zelltrümmer vom Extrakt zu trennen. Die Absorption der fertigen Extrakte bei 280 nm konnten nun im Photometer gemessen werden. Mit der Formel $\frac{6,4}{\epsilon} = [30\mu g Protein]\mu l$ wurde die entsprechende Pipettiermenge errechnet. Alle Proben stammten von nachweislich HBV/HCV negativen Probanden.

3.1.2. Extrakte aus transfizierten HuH-7-Zellen

Die Zellen wurden nach der Transfektion aus den Zellkulturschalen mit Hilfe von Trypsin/Medium und Zellschaber mobilisiert und in ein 15 ml Probengefäß überführt. Es folgte das Abzentrifugieren der Zellen bei 1200 U/min, 4°C über 10 min. Der Überstand wurde verworfen, zum Ausspülen der Mediumreste wurden 5 ml PBS zugegeben. Nach erneutem Zentrifugieren (1200U/min, 4°C, 10 min) und Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet im Plastikröhrchen mit 150 µl 2x-

Sample-Buffer überschichtet und sofort auf Eis gelegt. Dann folgte der Ultraschallaufschluss für 15s, die Proben im Anschluss sofort auf Eis gelegt. Anschließend die wurden Proben für 5 min gekocht. Auch hier wurden die nun denaturierten und in 2x-Sample-Buffer gelösten Extrakte im letzten Schritt bei 14000 U/min, 4°C über 5 min zentrifugiert, um eventuell zurückgebliebene Zelltrümmer vom Extrakt zu trennen. Die Absorption der fertigen Extrakte bei 280 nm konnte nun im Photometer gemessen und die entsprechende Pipettiermenge mit der Formel $\frac{6,4}{\epsilon} = [30\mu\text{g Protein}]\mu\text{l}$ berechnet werden.

3.2. Messung von relativen Proteingehaltsänderungen

3.2.1. SDS-PAGE

(Laemmli 1970; Sambrook et al. 1989)

Die Grundlage der SDS-Gelelektrophorese ist die Anlagerung von SDS-Molekülen an Proteine. Dazu wurden die Proteinproben mit einem Überschuss an SDS (2x Samplebuffer) unter hohen Temperaturen inkubiert. So erfolgte unmittelbar mit der Denaturierung eine Anlagerung der SDS-Moleküle. Die Proteine wurden so mit einer negativen Ladung versehen, die proportional zu ihren hydrophoben Aminosäureresten ist. Da dadurch auch die Eigenladung des Proteins weitgehend überdeckt wurden, erfolgte die Auftrennung nun fast ausschließlich nach Molekülgröße. Die negativ geladenen Proteinefragmente wurden durch das Acrylamidgel zur Anode transportiert, wobei große Proteine langsamer, und kleine Proteine sehr viel schneller durch die engen Poren gelangen. Die Porenweite des Polymers war durch das Variieren des Verhältnisses zwischen AA und BIS-AA frei wählbar. Durch die Zugabe von APS und TEMED (Katalysator) wurde die Polymerisierung endgültig gestartet. Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde ein Verfahren zur schärferen Proteintrennung durch den Einsatz eines in pH und Porengröße verschiedenen Sammel- und Trenngels angewendet (Schagger et al. 1987). Dadurch bildete sich an der pH-Umschlagsgrenze zwischen grobporigem Sammel- und feinporigen Trenngel eine schärfere, einheitliche Lauffront.

3.2.1.1. Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels

Zunächst wurden zwei Glasplatten(14,5 x 16,5 cm) mit an drei Seiten eingelegten Teflon-Spacern unter Verwendung von 6 Metallklemmen aneinander geklemmt. Anschließend diese drei Seiten mit 1%iger Agarose abgedichtet. Die Dichtigkeit wurde durch das Eingeben von destilliertem Wasser geprüft. Dann wurde der schmale Raum zwischen den Glasplatten bis ca. 3cm unter die Oberkante mit flüssigem SDS-Polyacrylamid-Trenngel aufgefüllt, welches wegen der kurz vor dem Einfüllen erfolgten Zugabe von APS & TEMED rasch auspolymerisierte. Der restliche Raum wurde mit destilliertem Wasser überschichtet.

War das Trenngel genügend fest polymerisiert, wurde das destillierte Wasser abgegossen. Der entstandene Hohlraum wurde mit flüssigem Sammelgel befüllt. Umgehend wurde ein mit Zähnen versehener Teflon-Spacer eingeführt, welcher nach der Polymerisierung des Sammelgels die Taschen für die Applikation der zu trennenden Proben bildete.

Tabelle 3: Rezept für 10%iges SDS-PA-Gel

	Trenngel	Sammelgel
Trenngel- /Sammelgelstock	4,0 ml	1,25 ml
Acrylamid (30%)	5,3 ml	750 µl
Bisacrylamid (2%)	2,12 ml	300 µl
H ₂ O _{bidest}	4,58 ml	2,7 ml
APS (10%)	140 µl	50 µl
TEMED	14 µl	20 µl

3.2.1.2. Durchführung einer SDS-PA-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Nach der Entfernung des Teflon-Kamms und des gegenüberliegende Spacers wurden die nun lediglich noch an den Seiten abgedichteten Glasplatten vertikal in ein Kammersystem eingespannt, so dass Ober- und Unterkante des Gels luftblasenfreien Kontakt zum SDS-Laufpuffer aufwiesen. Nun erfolgte das Pipettieren von 10 µl LMW in Tasche 1 und das Auftragen von jeweils 30 µg zu messender Proteinprobe in die anderen. Es wurde über den SDS-Laufpuffer eine „Top-Down“-

Spannung angelegt, die die Proben mit 25 mA für ca. 20 Minuten durch das Sammelgel und anschließend für ca. 2 Stunden bei 35 mA durch das Trenngel zur Anode transportierte. Kurz bevor die durch das Bromphenolblau deutlich erkennbare Proteinfront die Unterkante des Trenngels erreichte wurde die Spannung abgeschaltet und das Gel durch vorsichtiges Ablösen der oberen Glasplatte freigelegt.

3.2.2. Western-Blot

(Towbin et al. 1979)

Die im Trenngel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden durch das Anlegen einer vertikal zur Oberfläche gerichteten Spannung vom SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran im Transferpufferbad direkt auf das Gel gelegt und Blasenfrei zwischen zwei Zellulosefilter geklemmt. Dieses Sandwich wurde zwischen zwei Kunststoffgitter geklemmt und in die mit Transferpuffer befüllte Hoefer TE-Kammer gesteckt. Es folgte der Blot unter 400 mA (bei 20 V) über eine Stunde. Hierbei wurden die negativ geladenen Proteine durch das elektrische Feld auf die Membran übertragen und blieben Aufgrund kovalenter Bindungen und hydrophober Wechselwirkungen dort haften. Anschließend wurde der fertige Blot in PonceauS-Färbelösung gelegt. So war, dank der unspezifischen Bindung des PonceauS an die auf der Membran befindlichen Proteine, eine erste Einschätzung zur korrekten und gleichmäßigen Ladung möglich. Da die Färbung sich gut mit H₂O abspülen ließ und die aufgetragenen Proteine für die weitere Behandlung nicht beeinflusste (Salinovich et al. 1986) wurde dieser Schritt konsequent vor weiteren (Immun-)Färbungen durchgeführt.

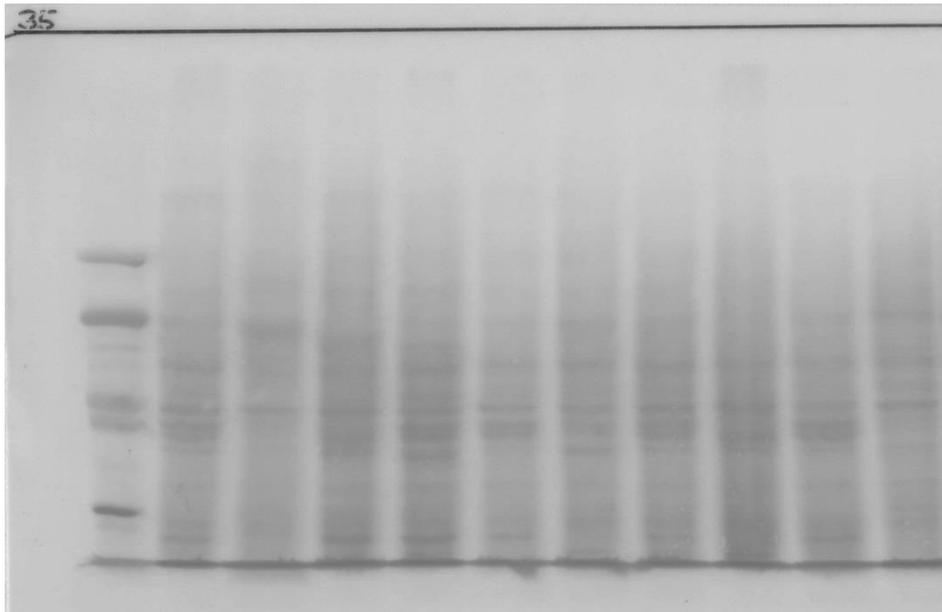


Abbildung 6: Blot nach PonceauS-Färbung (s/w Kopie)

Man erkennt deutlich den LMW-Marker in der ersten Spur, es folgen 5 Paare mit jeweils Normal- und Tumorgewebe. Die Intensität der Färbung lässt folgern, dass hier annähernd gleich viel Proteinmenge aufgetragen wurde.

3.2.3. Detektion durch Immunfärbung

(Whitehead et al. 1979)

Während dieser Arbeit wurde mit der Methode des ECL Westernblottings gearbeitet. Dazu wurde zunächst sorgfältig mit H_2O das PonceauS ausgewaschen und anschließend Blockingpuffer zugegeben, um die freien Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran zu besetzen. Anschließend wurde der Blot mit einem Gemisch aus Primärantikörper und 5%iger PBS-Milch in Klarsichtfolie eingeschweißt und bei $4^{\circ}C$ auf dem Taumler über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde der Blot dann für 3 x 15 Minuten mit PBS gewaschen und erneut mit Sekundärantikörper_(5%-PBS-Milch) inkubiert. Nach 1 Stunde bei $4^{\circ}C$ auf den Taumler erfolgte erneutes Waschen 3 x 15 Minuten mit PBS.

Im Photolabor wurde ECL-Mix mit H_2O_2 versetzt und dieses Gemisch anschließend auf den Blot gegeben. In diesem alkalischen Puffersystem wurde das im ECL enthaltene Luminol durch die Meerrettich-Peroxidase oxidiert. Die hierbei emittierte, verbesserte Chemilumineszenz hat ihr Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge

von 428 nm und ist ca. 100 mal stärker als herkömmliche Chemilumineszenzverfahren wie zum Beispiel bei der Anwendung von TMB (Olsson et al. 1982).

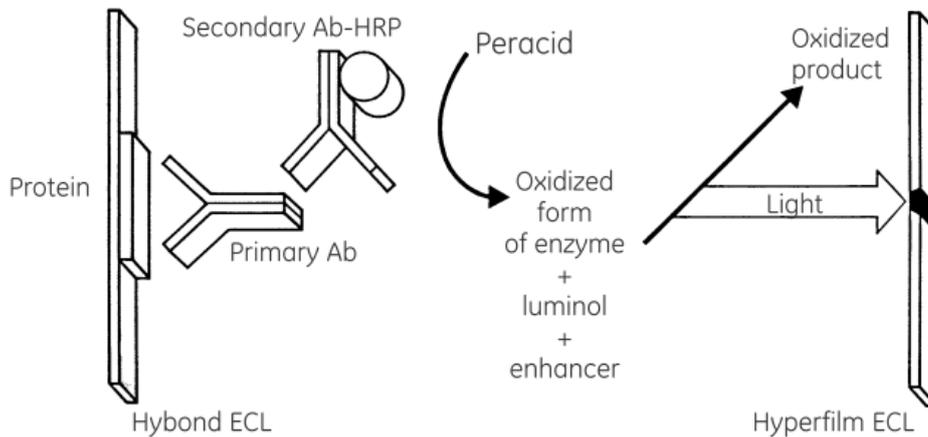


Abbildung 7: Prinzip der verbesserten Chemilumineszenz

Ab-HRP: Antibody-horseradish-peroxidase

Zur quantitativen Erfassung der hauptsächlich im Blauspektrum abgegebenen Photonen wurde der blau-licht-sensitive Amersham Hyperfilm ECL aufgelegt (Whitehead et al. 1979; GE-Healthcare 2009). Es folgte Entwickeln und Fixieren unter Rotlicht.

Im Anschluss wurde der Blot gründlich für 2 x 10 Minuten in PBS gewaschen. Die Membran wurde dann ohne weiteres Stripping erneut mit Primärantikörper 14C10 (GAPDH, Cell-Signaling) inkubiert (weiteres Vorgehen wie oben). Diese Form der sequentiellen Immunodetektion ist für Extrakte bei denen mehrere, verschiedene Antigene getestet werden sollen, statthaft (Kaufmann et al. 1987).

3.3. Eukaryotische Zellkultur

3.3.1. Kultur von HuH7-Lyon-Zellen

Die adhärenenten HuH7-Lyon-Monolayer-Zellen wurden in „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ („DMEM“, PAA) unter Zugabe von 10% fötalem Kälberserum, 1% Penicilin / Streptomycin (PAA) und 1% nicht-essentieller Aminosäuren (100x, PAA) bei 37°C, 5% CO₂ in 75cm² Zellkulturflaschen (SARSTEDT) im Brutschrank kultiviert. Da sich die phänotypischen Eigenschaften der Zelllinie bei zu hoher Zelldichte (90-100%) ändern (Nakabayashi et al. 1984), wurde nach Sichtkontrolle im Dunkelfeldmikroskop regelmäßig Mo – Mi – Fr gesplittet (1:10). Hierbei wurde zunächst das alte Medium abgenommen und die Kultur mit 10ml sterilem PBS (vorsichtig) gespült.

Anschließend wurden 3ml Trypsin (PAA) zugegeben und für 3 Minuten im Brutschrank (37°C, 5% CO_s) erwärmt. Nach vorsichtigem Klopfen auf den Flaschenboden zum Lösen der Zellen wurde die enzymatische Aktivität des Trypsins durch Zugabe von 7ml Medium gestoppt. Es folgte sorgfältiges Abspülen des Flaschenbodens durch mehrmaliges Aspirieren der Flüssigkeit. 1ml wurde in der Flasche belassen, der Rest für die Experimente verwendet oder verworfen.

3.3.2. Zellzählung (CASY)

Die Transfektion der Huh-7-Zellen erwies sich als schwierig. Um eine optimale Transfektion zu gewährleisten und gleichzeitig leicht unter 90% Zelldichte zu bleiben, wurde zunächst eine Zellzählung mittels CASY-Counter (Schade) durchgeführt. So war ein standardisiertes Auftragen von $2 \cdot 10^6$ Zellen möglich. Dazu wurden 8 µl der im Medium mobilisierten Zellen in 8 ml Elektrolytlösung (CASYton, Innovatis) resuspendiert. Diese Zellsuspension mit nun bekannter Verdünnung (1:1000) wurde durch den CASY-Counter aspiriert und unter Strom gesetzt. Die Integrität und Größe der Zellmembran bestimmte über den Grad der Leitfähigkeit für Strom. Lebendige, große, intakte Zellen leiteten den Strom fast gar nicht, wirkten also als elektrische Isolatoren mit hohem Widerstand. Tote Zellen und kleine Zellfragmente hingegen leiteten den Strom gut und hatten einen nur geringen Widerstand. Diese Veränderungen des Widerstandes wurden gemessen und in einem Histogramm

ausgegeben. So lassen sich die Zellen anhand ihrer Vitalität (Membranintegrität), Größe und Zellzahl differenzieren.

3.3.3. Transfektion von Huh7-Zellen mit Nanofectin

(Nanofectin Kit Manual, PAA, USA)

Nanofectin ist eine Transfektionsreagenz, die eine hohe Transfektionseffizienz bei gleichzeitig niedriger Zelltoxizität sicherstellen soll. Dabei ist die Wirkung unabhängig von der Anwesenheit von Serumbestandteilen. Nanofectin besteht aus einer positiv geladenen, DNA-bindenden Domäne und einem schützenden Nanopartikel. Die zu transfizierende DNA wird im Inneren des Nanopartikels gebunden und ist somit gegen Degradation z.Bsp. durch Nukleasen geschützt. Dieser DNA-Nanofectin-Komplex hat dann eine spezifische Größe erreicht, die die Aufnahme des Komplexes in die Zelle durch Endozytose ermöglicht. „Unbeladene“ Komplexe werden nicht aufgenommen. Es wurden 2×10^6 Zellen auf 100x20 mm Zellkulturschalen ausgesät und für 24 h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Anschließend erfolgte die Transfektion mit 25 µl Nanofectin und 8 µg DNA pro Schale. Zum Schluss wurde dann bereits nach 24h geerntet.

4. Ergebnisse

4.1. Entnahme und Aufarbeitung der Proben

Die verwendeten Gewebeproben wurden über einen Zeitraum von 5 Jahren bei Leberresektions-Operationen im Uniklinikum Homburg entnommen. Es gab keine spezifischen Einschlusskriterien für die Entnahme, bei der Auswahl der Proben für diese Studie wurden alle verwertbaren Probenpaare verwendet. Neben Patientenalter und Geschlecht sind die Tumorgöße, das Tumorstadium und die pathologisch gesicherte Tumorentität sehr gut dokumentiert und wurden für diese Arbeit herangezogen. Mangels spezifischer Einschlusskriterien war eine zweifelsfreie Randomisierung jedoch nicht gegeben. Es ergab sich ein w:m-Verhältnis von 8:10, das durchschnittliche Alter bei OP betrug ~ 63 Jahre. Unter den 18 Lebertumoren waren 12 eindeutig hepatozellulären Ursprungs, 4 konnten cholangiozellulären und 2 gemischten Formen zugeordnet werden.

Tabelle 4: Liste der verwendeten Probenpaare

Probenpaar	Geschlecht	Alter	Tumorgöße in cm (max. Dimension)	TNM	Histologie
1	W	63	6,1	T4NxMx	CCC
2	M	60	5,5	T3NxMx	CCC
3	M	68	7	T2N1M0	HCC/CCC
4	W	72	6,5	T3N0M0	HCC
5	M	62	3	T1N0M0	CCC
6	M	67	2	T1N0M0	HCC
7	W	39	15	T4N1M1	HCC/CCC
8	M	68	3,2	T1N0M0	HCC
9	M	74	6,9	T2NxMx	HCC
10	W	46	3,2	T1NxMx	HCC
11	W	69	10,8	T3N0M0	HCC
12	W	75	5,8	T1N0M0	HCC
13	W	53	5	T2N1M0	HCC
14	M	65	14	T1NxMx	HCC
15	W	67	8	T3N1Mx	CCC
16	M	75	9	T3N1M1	HCC
17	M	58	11,5	T3N0M0	HCC
18	M	56	15	T2N1M0	HCC

Die Aufarbeitung der Proben gestaltete sich als schwierig. Das Hauptproblem war eine gleichbleibende Qualität der Proteinextrakte zu gewährleisten. Trotz identischer und höchst sorgfältiger Aufarbeitung wiesen die Proben teilweise große Unterschiede in ihrer Konzentration auf. Aufgrund zu niedriger Konzentrationen wurden 6 Probenpaare verworfen (nicht in Tab. 4 dargestellt). Alle in dieser Arbeit verwendeten Probenpaare wiesen ähnliche Proteinkonzentrationen auf. Um Messfehlern entgegenzuwirken wurde bei allen Proben in einem Photometer die (optische) Dichte bei 280nm gemessen und damit für jede Probe eine spezifische Pipettiermenge berechnet (s. Kap. 4.1).

4.2. Western-Blots

Entsprechend dieser Pipettiermengen wurden die Proben auf SDS-Gele aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Eine anschließende Färbung mit PonceauS (reversible Färbung aller Proteine auf der Cellulose) gab Aufschluss über die korrekte Berechnung der Pipettiermengen. Obwohl es zwischen den Aufbereitschargen geringe Unterschiede gab, wurde auf eine Vergleichbarkeit der Proben untereinander Wert gelegt.

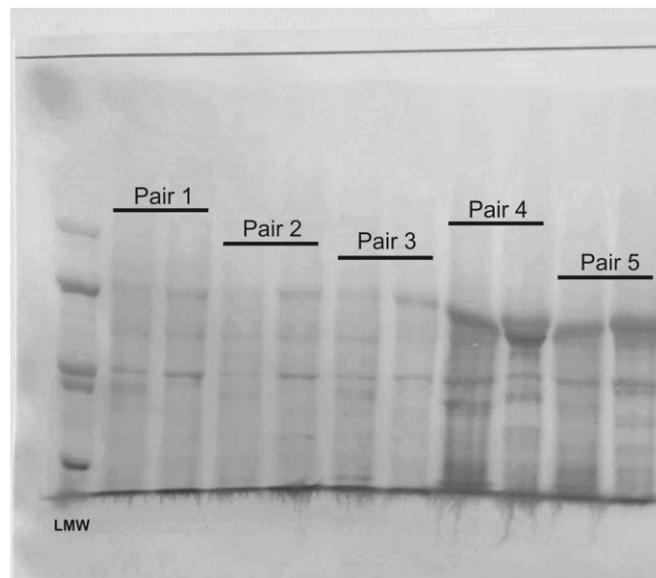


Abbildung 8: PonceauS-Färbung der Aufbereitschargen im Vergleich

Die Paare setzen sich jeweils aus einer Normalprobe (N) und einer Tumorseite (T) zusammen. Man erkennt den Unterschied in der Gesamtproteinmenge zwischen Extrakten aus Charge 1 (Paare 1-3) und Charge 2 (Paare 4+5).

War das Ergebnis der PonceauS Färbung entsprechend gut, wurde der Blot zunächst mit dem RBM4 Antikörper und dann mit dem GAPDH-Antikörper inkubiert. Während die Ergebnisse mit den RBM4 Antikörpern gut quantifizierbar waren, wiesen die GAPDH-Banden bei manchen Blots trotz der sehr guten Färbungen unterschiedliche Intensitäten auf. Exemplarisch ist auf Abb. 9 ein fertiger Blot zu sehen, alle verwerteten Probenpaare sind im Appendix gegenüber gestellt.

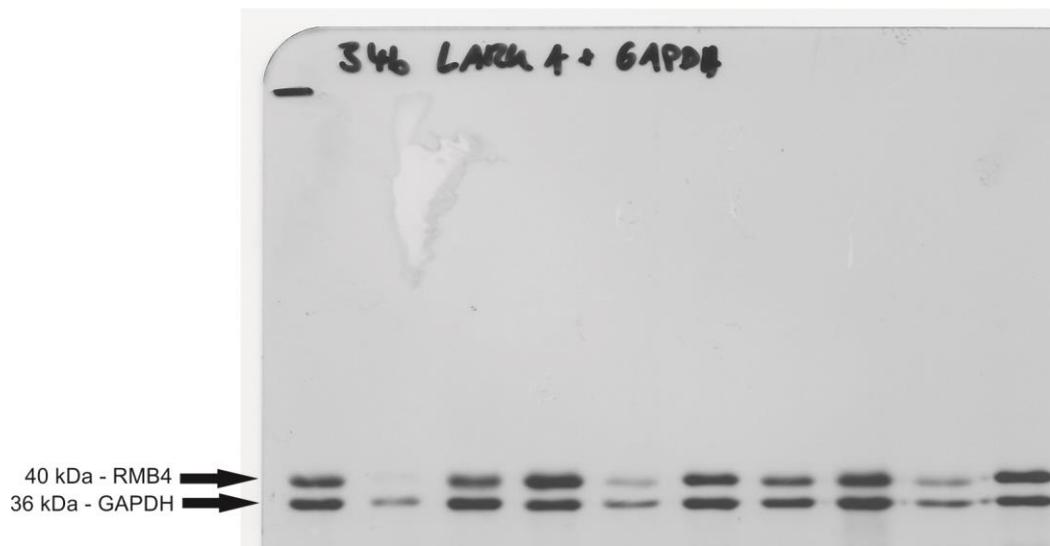


Abbildung 9: Western-Blot der Lark-A-Messreihe

(exemplarisch; steht nicht in Zusammenhang mit Abb. 8)

Obwohl sorgfältig auf eine gleichmäßige Beladung der einzelnen Spuren geachtet wurde, gibt es Varianzen in der GAPDH- Quantität.

4.3. Quantifizierung und Auswertung

Um trotz der GAPDH-Varianz gute, vergleichbare Ergebnisse zu erzielen wurde bei der Quantifizierung sowohl die GAPDH-Bande, als auch die RBM4-Bande von der herrschenden Hintergrundfarbe abgezogen, um dann die Intensität der RBM4-Bande im Verhältnis zur GAPDH-Bande zu quantifizieren.

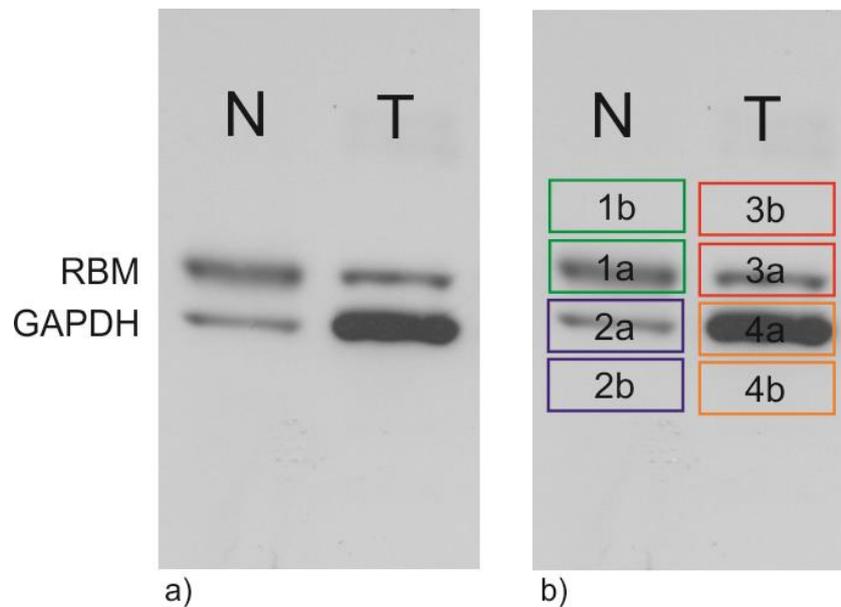


Abbildung 10: Exemplarische Darstellung der Proteinquantifizierung

Bild a) zeigt ein Probenpaar mit Normal- (N) und Tumorgewebe (T), Bild b) zeigt die entsprechenden Ausschnitte, die im Quantifizierungsprogramm markiert und anschließend verrechnet wurden. Erläuterung im Abschnitt 5.3.

Die Quantifizierung lieferte zunächst Werte relativ zur jeweiligen GAPDH-Menge, welche dann vergleichend zwischen Normal- (N) und Tumorgewebe (T) ins Verhältnis gesetzt wurde. So wurde eine relative Änderung (rA) der Proteinmenge zwischen N und T-Gewebe ermittelt. Die folgenden Formeln beziehen sich auf Abb. 10 und sollen dieses Vorgehen exemplarisch illustrieren.

$$\text{Probenintensität } I_{N/T} = \frac{\text{Probe} - \text{Background}}{\text{GAPDH} - \text{Background}}$$

$$\text{es ergibt sich: } I_N = \frac{1a - 1b}{2a - 2b} \text{ bzw. } I_T = \frac{3a - 3b}{4a - 4b}$$

$$\text{relative \u00c4nderung } rA = \frac{I_T - I_N}{I_N} * 100 (\%)$$

Die Auswertung dieser Messdaten best\u00e4tigt unsere Vermutung, dass RBM4b in Tumorzellen im Vergleich zum Normalgewebe deutlich reduziert ist. F\u00fcr RBM4a scheint sich keine solch eindeutige Tendenz abzuzeichnen.

Tabelle 5: relative \u00c4nderung RBM4a/b von Normal- zu Tumorgewebe

Probenpaar	RBM4 a	RBM4 b
1	151,45 %	-84,74 %
2	60,40 %	-95,69 %
3	-61,75 %	-87,64 %
4	134,45 %	-80,17 %
5	-64,41 %	-99,20 %
6	133,95 %	-99,26 %
7	-82,40 %	-76,11 %
8	134,92 %	76,38 %
9	123,48 %	-87,64 %
10	17,69 %	-37,63 %
11	268,34 %	-98,56 %
12	-42,75 %	-94,60 %
13	119,92 %	-85,49 %
14	114,56 %	-34,89 %
15	66,23 %	-14,97 %
16	-1,43 %	-15,14 %
17	-67,50 %	-47,24 %
18	-36,48 %	-84,36 %

Eine komplette Liste der gemessenen und verrechneten Werte, sowie eine Gegen\u00fcberstellung der gemessenen RBM4b-Paare mit ihrer jeweiligen Ladekontrolle befinden sich im Appendix (Seite 61 ff.). F\u00fcr die grafische Auswertung dieser relativen Ver\u00e4nderungen erfolgt zun\u00e4chst die Berechnung der rA durch SigmaBlot, welches dann die Ergebnisse f\u00fcr die beiden Proteine getrennt in einem Boxplot auftrug.

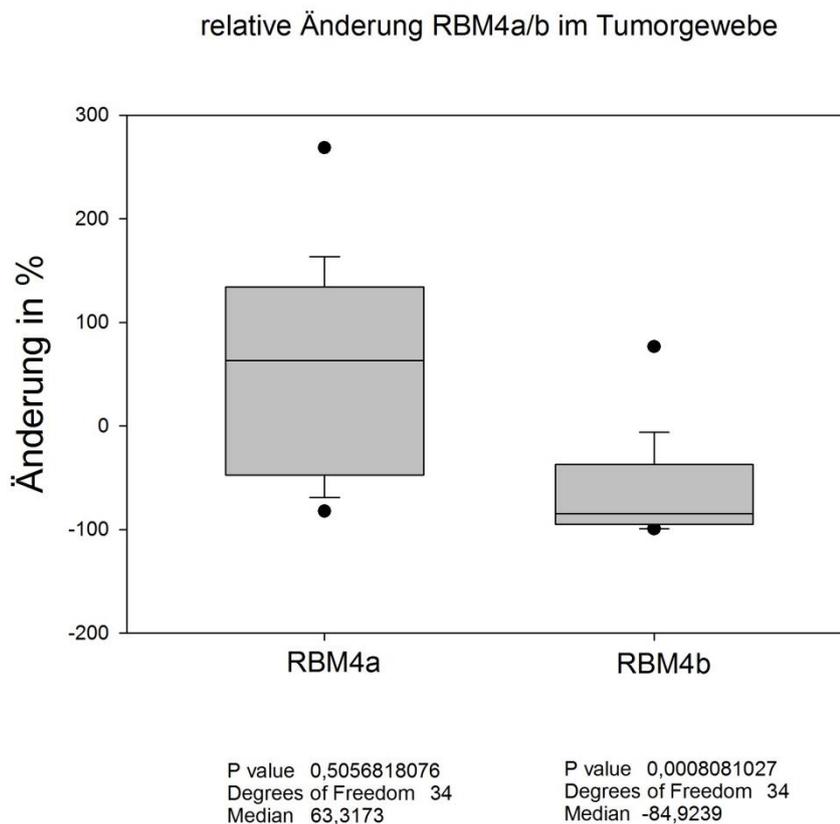


Abbildung 11: relative Änderung von RBM4 a/b im Tumorgewebe

Links für RBM4a – keine klare Tendenz

Rechts für RBM4b – mit hoher Signifikanz erfolgt eine mittlere Abnahme von ~85%

Während die Erniedrigung von RBM4b im Tumorgewebe (im Mittel um ~ minus 85%) mit hoher Signifikanz ($p = 0,0008$) bei fast allen Proben zu erkennen ist, scheint RBM4a einen Trend zur Erhöhung zu haben. Diese Veränderung des RBM4a-Gehalts ist allerdings nicht signifikant und variiert sehr stark zwischen einer Abnahme von ~ minus 82% und einer Erhöhung von über 200%.

4.3.1. RBM4b-Erniedrigung im Tumorgewebe

Eine signifikante RBM4b-Erniedrigung zeigte sich mit einer Ausnahme von Probe 8 bei allen gemessenen Probenpaaren. Dabei scheint die Abnahme des RBM4b-Gehalts keiner offensichtlichen Gesetzmäßigkeit zu folgen. Eine Korrelation der RBM4b-Abnahme mit TumorgroÙe (gemessen in maximaler Tumordimension in cm)

und Tumorstadium (als „T“-Stadium nach geltender TMN-Klassifikation, (Wittekind et al. 2011)) ergaben nach linearer Regression mit einer Signifikanz von $p = 0,8744$ eine durchschnittliche RBM4b-Abnahme von 0,44% pro cm Tumorgröße und mit einer Signifikanz von $p = 0,5238$ eine RBM4b-Abnahme um 6,9% pro durchlaufenem Tumorstadium.

Die RBM4b-Abnahme ist folglich unabhängig von Tumorgröße und weitgehend unabhängig vom Tumorstadium.

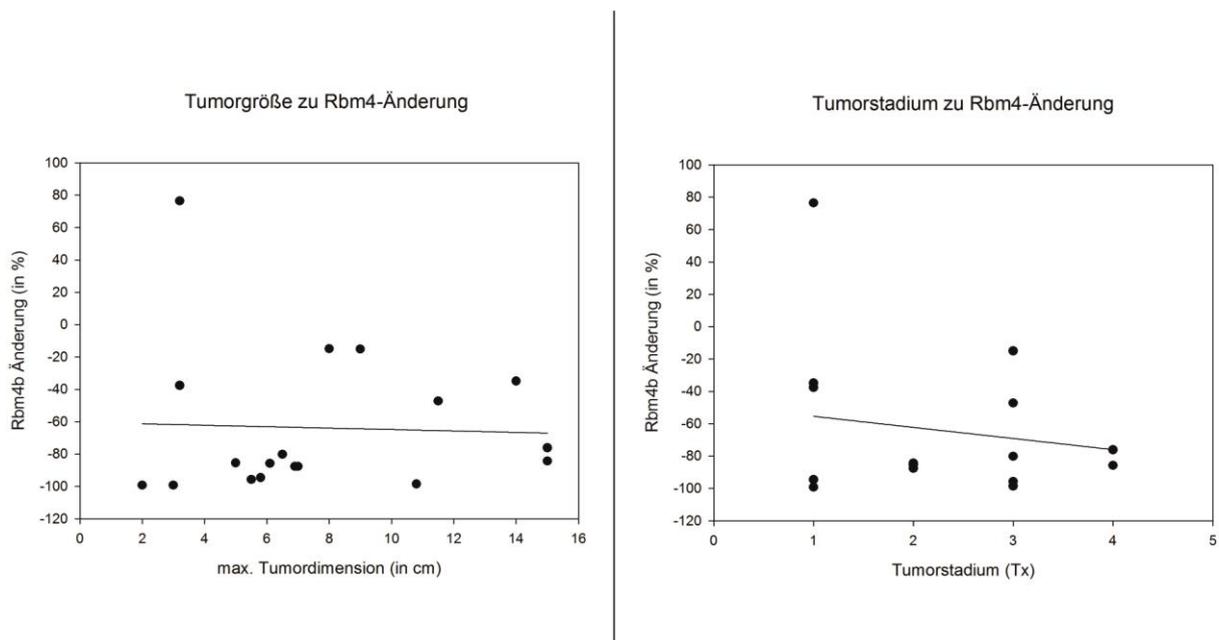


Abbildung 12: Korrelation von Tumorgröße / Tumorstadium zur RBM4b-Änderung

Weder bei der Korrelation mit der Tumorgröße (links) noch mit dem Tumorstadium (rechts) ist eine eindeutige Korrelation abzuleiten. Neben den einzelnen Messwerten (•) sind die nach linearer Regression erzeugten Regressionsgeraden verzeichnet.

Die RBM4b-Erniedrigung ist unabhängig von Geschlecht (75% Konfidenzintervall (KI) nahezu identisch, s. Appendix) und Alter (lin. Regression, s. Appendix), allerdings scheint eine massive RBM4b-Erniedrigung von über minus 50% bei Lebertumoren histologisch cholangiozellulären (CCC) Ursprungs oder teilweise cholangiozellulären (HCC/CCC) Ursprungs gehäuft auf zu treten (Abb. 13). Um diese Vermutung aber

sicher zu untermauern, sind aufgrund der geringen CCC- bzw. HCC/CCC-Probenzahl weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen nötig.

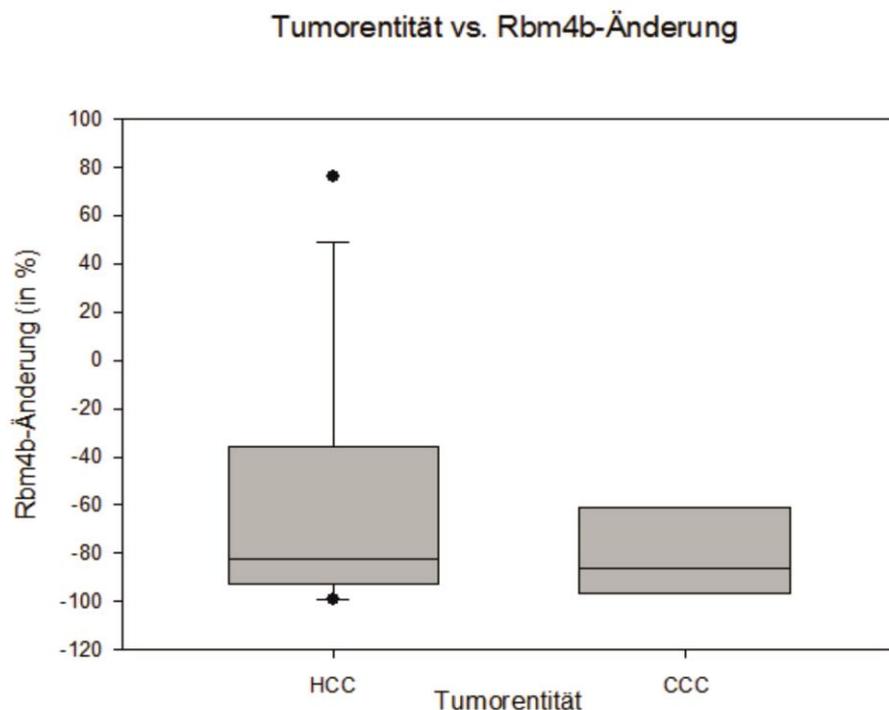


Abbildung 13: Rbm4b-Änderung vs. Tumorentität

Die Rbm4b-Abnahme in Lebertumoren hepatozellulären Ursprungs (HCC) streut stark, während die Abnahme bei Lebertumoren cholangiozellulären Ursprungs (CCC) durchweg stark negativ ausfällt.

4.3.2. Veränderung des RBM4a Gehalts

Die Veränderung des RBM4a-Gehalts wies eine breite Streuung auf. Er war im Gegensatz zu RBM4b nicht konstant erhöht oder reduziert in Tumor- oder Normalgewebe (s. Abb 11). Auch für RBM4a wurde eine Beeinflussung durch Geschlecht und Alter weitgehend ausgeschlossen, es existiert wohl eine leichte Tendenz zu erhöhtem RBM4a beim älteren Patienten (s. Appendix).

Interessanterweise zeigte sich bei einer Korrelation der RBM4a Änderung mit der Tumorgöße ein deutlich stärkerer Zusammenhang als zuvor bei RBM4b. So sank der RBM4a Gehalt im Tumor um im Mittel ca. 5% pro cm Tumordimension (p

=0,4017). Auch die RBM4a-Änderung war weitgehend unabhängig vom durchlaufenen Tumorstadium. Auffallend war die im Vergleich zu RBM4b genau gegensätzliche Tatsache, dass RBM4a vor allem in Tumoren histologisch hepatocellulärem (HCC) Ursprungs erniedrigt zu sein scheint. Auch diese Tatsache ist aufgrund der geringen CCC Probenzahl nur eingeschränkt beurteilbar.

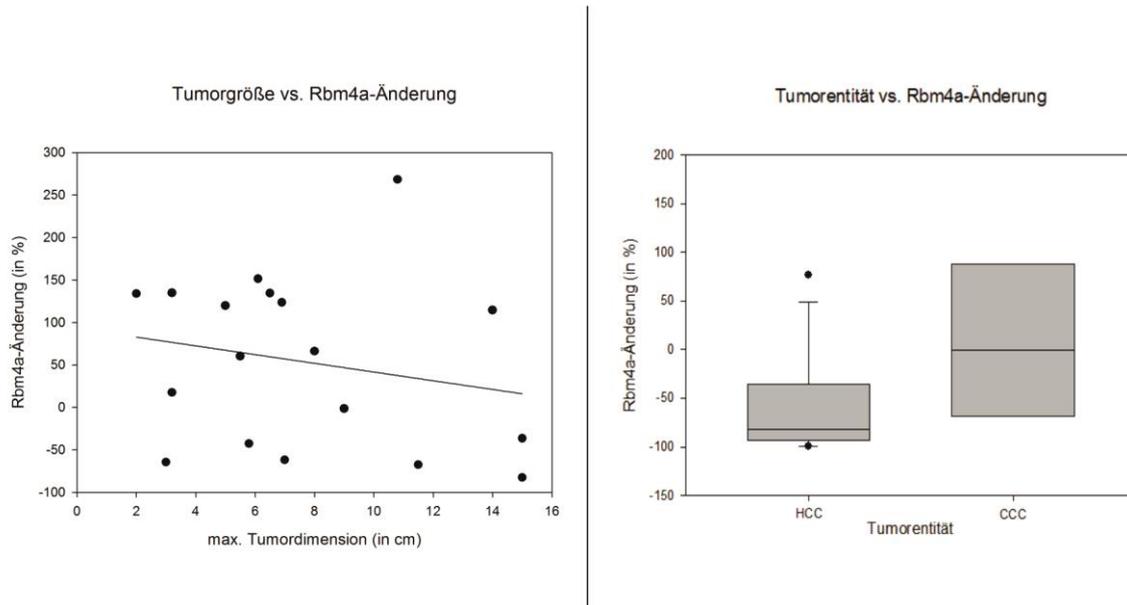


Abbildung 14: RBM4a vs. Tumorgroße /-entität

Links die Korrelation von RBM4a mit der Tumorgroße, die Regressionsgerade lässt auf eine Abnahme von RBM4a in größeren Tumoren um ~ 5% pro cm schließen ($p=0,4017$).

Rechts die prozentuale Änderung des RBM4a Gehalts im Vergleich zwischen Tumoren hepatocellulärer (HCC) und cholangiozellulärer (CCC) Herkunft.

4.3.3. Zusammenhang der Proteingehaltsänderungen

Nach Lai et al befindet sich das Gen für RBM4a komplett innerhalb des zweiten Introns von RBM4b (Lai et al. 2003). Die Vermutung liegt also nahe, dass eine Herabregulation von RBM4b die Expression von RBM4a nachhaltig beeinflusst. Trägt man die prozentualen Veränderungen der beiden Proteine als XY-Paar in einem Diagramm auf (Abb. 15) stellt man allerdings erstaunlicher Weise fest, dass die Veränderungen des RBM4a/b-Gehalts unabhängig voneinander auf zu treten

scheinen. Es besteht offensichtlich kein festes Verhältnis zwischen RBM4b-Reduktion und RBM4a-Änderung.

Zusammenhang der Proteingehaltsänderungen

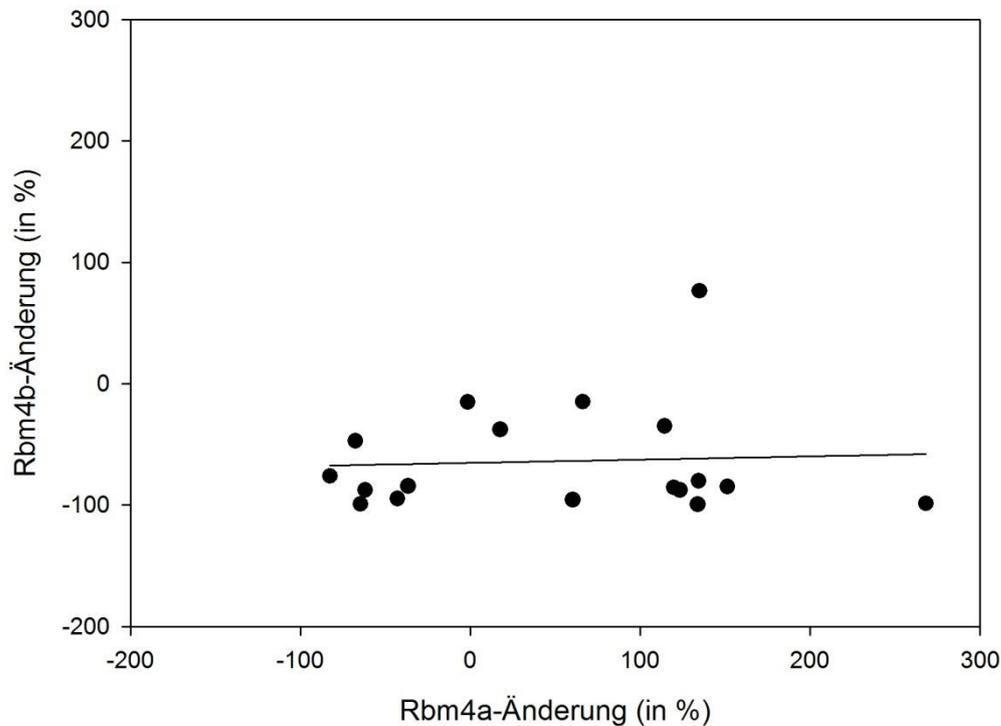


Abbildung 15: RBM4a- vs. RBM4b-Änderung

Es ist kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen den Veränderungen zu erkennen. Wäre das Verhältnis zwischen den Veränderungen konstant, müsste die Regressionsgerade bei gleichem Maßstab von x- und y-Achse annähernd mit einer Steigung von $a = 1$ verlaufen. Regression liefert: $a = 0,0268$

Um diese These weiter zu untermauern, wurden Huh7-Zellen durch eine Nanofectin-Transfektion mit pSG5-gekoppeltem RBM4a bzw. RBM4b transfiziert. Dabei wurde zur Erfolgskontrolle ein HA-Tag (RBM4a) bzw. ein FLAG-Tag (RBM4b) integriert. Insgesamt wurde diese Versuchsreihe 3mal durchgeführt. In keinem der Versuche konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von RBM4a und RBM4b hergestellt werden. Die endogene RBM4a Gehalt der Huh7-Zellen konnte zwar durch die zusätzliche Expression von RBM4a deutlich gesteigert werden, blieb durch eine zusätzliche Expression von RBM4b aber gänzlich unverändert. Gleichermäßen wurde der kaum messbare endogene RBM4b-Gehalt (Pfuhl et al. 2008) der Huh7-

Zellen durch die zusätzliches RBM4b sehr stark erhöht, blieb bei zusätzlicher RBM4a-Expression aber unverändert gering.

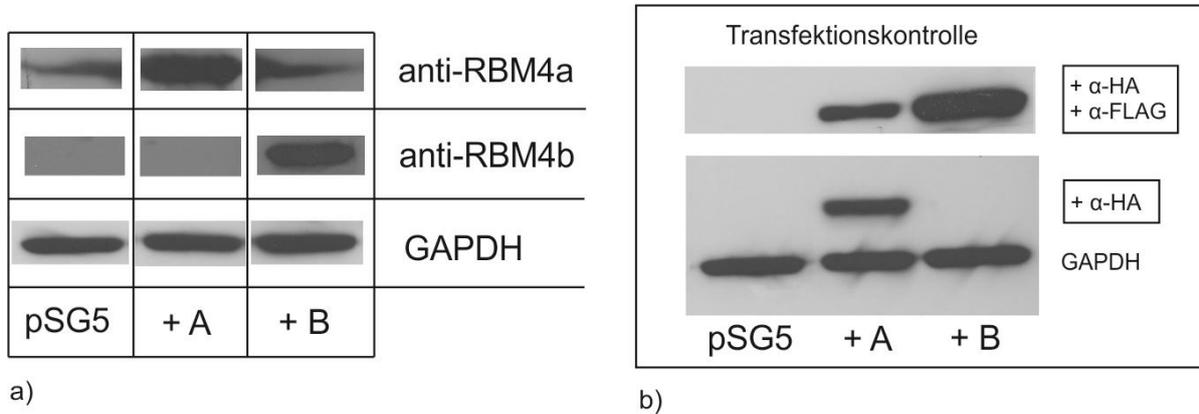


Abbildung 16: Huh7-Transfektion (exemplarisch)

Exemplarische Darstellung einer Huh7-Transfektion. Bild a) zeigt in den Spalten 1-3 die Banden der nativen Huh7-pSG5-Extrakte (pSG5), der mit HA-RBM4a (+A) und der mit FLAG-RBM4b transfizierten Zellextrakte. Auf Bild b) ist die erfolgte Transfektionskontrolle durch eine serielle Applikation von HA- bzw. FLAG-Antikörper zu erkennen.

Für den in Abb. 16 exemplarisch dargestellten Versuch ergeben sich nach einer Quantifizierung relativ zu den jeweiligen GAPDH-Banden folgende Werte:

Tabelle 6: Quantifizierung Transfektionsversuch

1,31347767	2,30217127	1,32381802	anti- RBM4a
0,01634984	0,01531421	1,34767487	anti- RBM4b
pSG5	+ A	+ B	
Referenz (native Huh7 + Leervektor)	+75% RBM4a RBM4b unverändert	RBM4a unverändert + < 8000% RBM4b	

Die Expression von RBM4a und -b scheint somit weitgehend unabhängig vom jeweils anderen Protein zu erfolgen, da eine messbare Veränderung nur dann auftritt, wenn die entsprechende Variante gezielt in die Zelle transfiziert wird.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der relativen Proteingehaltsänderung von RBM4a bzw. RBM4b in Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Durch die Auswahl von Probenpaaren aus derselben Leber konnten nicht-karzinombedingte Einflüsse auf den Proteingehalt weitgehend ausgeschlossen werden. Mit den Transfektionsversuchen an Huh7-Zellen wurde auch eine gegenseitige Transkriptionsbeeinflussung der Proteinvarianten ausgeschlossen. Es zeigte sich wie vermutet eine deutliche Abnahme des RBM4b-Gehalts im Tumorgewebe. Diese Tatsache widerspricht der Vorstellung, dass in tumorös verändertem Gewebe – mit Ausnahme von Tumorsuppressorgenen – am Zellstoffwechsel beteiligte Gene eher überexprimiert werden.

5.1. Gewinnung und Aufarbeitung der Probenpaare von HCC-Patienten

Die Gewinnung der Proben erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Otto Kollmar (Klinik für Allgemein Chirurgie im Universitätsklinikum Homburg) während der im Zeitraum von 2002-2010 durchgeführten Leberteilresektionen. Sie wurden für die Durchführung dieser Arbeit in flüssigem Stickstoff zur Verfügung gestellt. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit liegen für die Proben keine separaten pathologischen Begutachtungen vor, es ist also letztendlich nicht gänzlich auszuschließen, dass es bei Gewinnung oder Lagerung zu Verwechslungen gekommen sein könnte. Dies könnte beispielsweise bei Probenpaar Nummer 8 der Fall gewesen sein. Dort spricht die Änderung des RBM4b-Gehalts im Tumorgewebe eher für eine „Normal“-Probe.

Die Aufbereitung der Proben gestaltete sich teilweise als schwierig. Nach dem Lösen der Proben im SB-Buffer zeigten sich trotz minutiöser Einhaltung des Aufarbeitungsprotokolls photometrisch teilweise große Unterschiede in der Konzentration der Proben. Wir führen dies auf die Konsistenz der verwendeten Präparate zurück: einige der Proben waren so stark zirrhotisch verändert, dass sie sich wegen der hohen Elastizität auch im Metallkugelschredder nur schlecht mechanisch zerkleinern ließen.

5.2. Quantifizierung der Proben per Haushaltsgen

Um eine gute Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten war die Auswahl des Verfahrens zur Quantifizierung sehr wichtig. β -Actin (gene symbol: ACTB) kam wegen seiner Interaktion mit mir-145 als „housekeeping gene“ zur Quantifizierung nicht in Frage. Die als Tumorsuppressoren fungierende mir-145 interagiert mit vielen tumorassoziierten Genen (La Rocca et al. 2009; Chen et al. 2010; Drebber et al. 2011; Ren et al. 2013). So konnte zum Beispiel eine Deregulierung von mir-145 im Prostatakarzinom gezeigt werden, welche durch die Interaktion mit Myosin VI dessen Expression stark erhöht und den ACTB Gehalt deutlich reduziert (Szczyrba et al. 2010).

Schließlich wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gewählt, weil es zum derzeitigen Kenntnisstand als gut verwertbares Referenzgen im Tumorgewebe ausgewiesen ist (Szczyrba et al. 2010; Souza et al. 2013). Die Tauglichkeit von GAPDH als Referenzgen für Untersuchungen am HCC wird allerdings auch kontrovers diskutiert (Cicinnati et al. 2008; Gao et al. 2008). Es kam im Laufe dieser Arbeit zu geringfügigen Abweichungen zwischen der Ladekontrolle mit PonceauS und der entsprechenden Quantifizierung mit GAPDH. Eine mögliche Erklärung sind die neusten Erkenntnisse über den Einfluss der karzinogenen Mutationen an Schlüsselgenen für den Glukosestoffwechsel. So führt eine Mutation am Protoonkogen „hypoxia-inducible factor-1a“ (HIF1a) zu einer massiven Umstellung des intrazellulären Glukosestoffwechsels (Herbert et al. 2011). Dabei fokussieren sich die gravierenden Veränderungen auf sehr frühe Schritte des Glukosestoffwechsels, wie dem Transport von Glucose in die Zelle via Glucose-Transporter (GLUT) 1 und 3 (Mattmiller et al. 2011). GAPDH ist ein später Teil des Glukosestoffwechsels und wird von diesen Mutationen nur sehr wenig beeinflusst. So zeigte sich lediglich eine geringe Korrelation zwischen dem HIF1a Gehalt und der GAPDH-Expression (Monsef et al. 2007). Diese Tatsache lässt vermuten, dass ein erkennbarer Unterschied zwischen den Ladekontrollen lediglich bei sehr massiv veränderten Tumoren auftritt. Wir teilen die Meinung von Cicinnati et al. und halten GAPDH für das am besten geeignete Haushaltsgen zur Quantifizierung unserer Proben.

5.3. HCC spezifische Mutationen als Ursache für RBM4-Abfall?

In einer großangelegten Analyse von hepatozellulären und cholangiozellulären Karzinomzelllinien wurden spezifische Chromosomenaberrationen für diese Tumoren untersucht (Wilkens et al. 2012). Die Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen von Patil et al. zur chromosomalen Aktivität von HCC-assoziierten Genen (Patil et al. 2005). So konnten neben den Schwerpunkten der Aberrationen auf den Chromosomen 1, 8 und 13 auch Veränderungen auf Chromosom 11q12.3 nachweisen, einem Bereich der in unmittelbarer Nähe des Genlocus von RBM4 (11q13) liegt. Chromosomale Veränderungen in diesem Bereich sind nach Wilkens bei HCC und CCC gleichermaßen zu finden, was sich mit den Erkenntnissen aus dieser Arbeit deckt. Trotzdem scheint eine massive RBM4b Erniedrigung nach unseren Ergebnissen eher eine CCC spezifische Veränderung zu sein. Dies ist aufgrund der geringen Probenzahl (gesicherte CCC-Proben: 4 aus 18) leider nur bedingt beurteilbar. Hier wäre ein interessanter Ansatz für weitere Untersuchungen. Sollte sich der Zusammenhang bestätigen, könnte eine massive RBM4b Erniedrigung bei der histopathologischen Diagnosesicherung den Verdacht auf einen cholangiozellulären Ursprung bekräftigen.

5.4. RBM4 als Regulator im KRAS-Pathway

AGO2 co-sedimentiert mit großen Mengen von KRAS assoziierter mRNA und wurde – wenn mutiert – mit der Entstehung von Karzinomen in Verbindung gebracht (Kranenburg 2005). Für RBM4 wurde eine Funktionalität an der 3'-UTR des KRAS und die Interaktion mit multiplen miRNA targets nachgewiesen (Hock et al. 2007). Karzinogene Mutationen am Onkogen KRAS sind hauptsächlich in Pankreas-, Schilddrüsen-, Colon- und Lungenkarzinomen beschrieben (Kranenburg 2005). Manche KRAS Mutationen verursachen deutlich aggressivere Tumorphänotypen als andere (Samowitz et al. 2000), so werden für die Krebstherapie entwickelte Substanzen gezielt auf bestimmte, mit sehr schlechter

Prognose assoziierte KRAS Mutationen gerichtet (Friday et al. 2005). Der genaue Mechanismus hinter dieser Beobachtung ist ungeklärt.

Vielleicht wurde mit RBM4 ein wichtiger, repressiver Co-Faktor für die Selbstinaktivierung von KRAS entdeckt. Die konsequente Deregulierung im Tumorgewebe könnte somit trotz genotypisch intaktem KRAS eine überschießende Funktion des Onkogens verursachen. In unserer Arbeit haben wir beobachtet, dass die Quantität der relativen Abnahme von RBM4 nur schwach mit einem progredienten Tumorstadium assoziiert ist. Somit ist auch eine Kombination aus beidem – also einer Mutation des KRAS und einer fehlenden Inaktivierung durch RBM4 denkbar.

5.5. Beeinflussung von kritischen Zellzyklusgenen wie p53

Die Unterdrückung von p53 gilt als evidente, molekulare Ursache der Entstehung von Karzinomen des Menschen (Soussi 1996; Levine 1997). Kurze Zeit später wurde die funktionelle Integrität von p53 in Leberzellkarzinomen untersucht und mit dem Vorhandensein von Hepatitis-X-Antigen (HBx) in Verbindung gebracht. Dabei zeigte sich, dass die protektive Funktion von p53 in Hepatitis infizierten Leberzellen mit hohem HBx-Gehalt stark reduziert ist, nicht aber der p53-Gehalt per se (Greenblatt et al. 1997; Kew 1997). Das HBx-Antigen ist eine Proteinkinase und wird durch Autophosphorylierung aktiv. Es greift nicht nur direkt über die Beeinflussung von Apoptose und DNA-Reparatur in die Kontrolle des Zellzyklus ein, sondern es vermag auch durch Interaktion mit p53 dessen Interaktion mit wichtigen Substraten zu Inhibieren (Feitelson et al. 1997; Arbutnot et al. 2000). Diese funktionellen Einschränkungen von p53 führen ebenfalls zu Fehlern im Zellzyklus und letztendlich zur Entartung des Gewebes (Ueda et al. 1995; Dewantoro et al. 2006). Auch RBM4 wird durch Phosphorylierungsprozesse aktiv, welche vor allem durch zellulären Stress ausgelöst werden. Eine funktionelle Ähnlichkeit zum HBx wäre auch deshalb denkbar, weil auch für RBM4 sowohl Protein-Protein- (WT1), Protein-mRNA- (AGO) und Protein-DNA-Interaktionen (Exonselektion bei α -TM) nachgewiesen wurden (siehe Abschnitt 1.2.3.), die alle für sich oder in Kombination zu einer

Beeinflussung von kritischen Zellzyklusgenen führen könnten. Da RBM4b bei Zellstress vermehrt aktiv ist und dann die Translation von mRNA am endoplasmatischen Retikulum fördert, wäre in der gesunden Zelle von einer protektiven Funktion des RBM4b im Zellzyklus auszugehen (Lin et al. 2007; Lin, Tarn 2009). Wenn seine Funktion – analog der Interaktion des HBx mit p53 – kritisch für das korrekte Arbeiten eines Tumorsuppressorgenes oder die Beherrschung eines Protoonkogenes wäre, könnte der Verlust von RBM4b in der Leberzelle ein wichtiger Schritt in der Entwicklung von Leberzellkarzinomen darstellen.

6. Literaturverzeichnis

1. **Aguilar, F., S. P. Hussain, et al.** (1993). "Aflatoxin B1 induces the transversion of G->T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes." Proc Natl Acad Sci U S A 90(18): 8586-8590.
2. **Andrisani, O. M. and S. Barnabas** (1999). "The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis (Review)." Int J Oncol 15(2): 373-379.
3. **Arbuthnot, P., A. Capovilla, et al.** (2000). "Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways." J Gastroenterol Hepatol 15(4): 357-368.
4. **Beasley, R. P.** (1988). "Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma." Cancer 61(10): 1942-1956.
5. **Beitzinger, M., L. Peters, et al.** (2007). "Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes." RNA Biol 4(2): 76-84.
6. **Berman, J. J.** (1988). "Cell proliferation and the aetiology of hepatocellular carcinoma." J Hepatol 7(3): 305-309.
7. **Braun, L., R. Mikumo, et al.** (1989). "Production of hepatocellular carcinoma by oval cells: cell cycle expression of c-myc and p53 at different stages of oval cell transformation." Cancer Res 49(6): 1554-1561.
8. **Caceres, J. F. and A. R. Kornblihtt** (2002). "Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease." Trends Genet 18(4): 186-193.
9. **Caceres, J. F., G. R. Sreaton, et al.** (1998). "A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm." Genes Dev 12(1): 55-66.
10. **Chen, X., J. Gong, et al.** (2010). "MicroRNA145 targets BNIP3 and suppresses prostate cancer progression." Cancer Res 70(7): 2728-2738.
11. **Cicinnati, V. R., Q. Shen, et al.** (2008). "Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR." BMC Cancer 8: 350.
12. **Dechsukhum, C., J. L. Ware, et al.** (2000). "Detection of a novel truncated WT1 transcript in human neoplasia." Mol Diagn 5(2): 117-128.
13. **Dewantoro, O., R. A. Gani, et al.** (2006). "Hepatocarcinogenesis in viral Hepatitis B infection: the role of HBx and p53." Acta Med Indones 38(3): 154-159.
14. **Dominguez-Malagon, H. and S. Gaytan-Graham** (2001). "Hepatocellular carcinoma: an update." Ultrastruct Pathol 25(6): 497-516.

15. **Dragan, Y. P. and H. C. Pitot** (1992). "The role of the stages of initiation and promotion in phenotypic diversity during hepatocarcinogenesis in the rat." Carcinogenesis 13(5): 739-750.
16. **Drebber, U., M. Lay, et al.** (2011). "Altered levels of the onco-microRNA 21 and the tumor-suppressor microRNAs 143 and 145 in advanced rectal cancer indicate successful neoadjuvant chemoradiotherapy." Int J Oncol 39(2): 409-415.
17. **El-Serag, H. B.** (2012). "Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma." Gastroenterology 142(6): 1264-1273 e1261.
18. **Elzouki, A. N.** (1999). "Alpha 1-antitrypsin deficiency and related liver disease." Saudi J Gastroenterol 5(1): 1-8.
19. **Evarts, R. P., P. Nagy, et al.** (1987). "A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver." Carcinogenesis 8(11): 1737-1740.
20. **Evarts, R. P., H. Nakatsukasa, et al.** (1992). "Expression of transforming growth factor-alpha in regenerating liver and during hepatic differentiation." Mol Carcinog 5(1): 25-31.
21. **Feitelson, M. A. and L. X. Duan** (1997). "Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma." Am J Pathol 150(4): 1141-1157.
22. **Ferlay, J., D. M. Parkin, et al.** (2010). "Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008." Eur J Cancer 46(4): 765-781.
23. **Ferlay, J., H. R. Shin, et al.** (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." Int J Cancer 127(12): 2893-2917.
24. **Friday, B. B. and A. A. Adjei** (2005). "K-ras as a target for cancer therapy." Biochim Biophys Acta 1756(2): 127-144.
25. **Gao, Q., X. Y. Wang, et al.** (2008). "Selection of reference genes for real-time PCR in human hepatocellular carcinoma tissues." J Cancer Res Clin Oncol 134(9): 979-986.
26. **GE-Healthcare** (2009). AmershamECL Western blotting detection reagents and analysis system. Product Booklet Codes: RPN2106/8/9; RPN2209; RPN2134. GE-Healthcare. <http://www.gelifesciences.com>, GE Healthcare UK Limited. 2009.
27. **Gorayski, P., C. H. Thompson, et al.** (2008). "Hepatocellular carcinoma associated with recreational anabolic steroid use." Br J Sports Med 42(1): 74-75; discussion 75.
28. **Grasl-Kraupp, B., W. Bursch, et al.** (1994). "Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver." Proc Natl Acad Sci U S A 91(21): 9995-9999.

29. **Graveley, B. R.** (2000). "Sorting out the complexity of SR protein functions." RNA 6(9): 1197-1211.
30. **Greenblatt, M. S., M. A. Feitelson, et al.** (1997). "Integrity of p53 in hepatitis B x antigen-positive and -negative hepatocellular carcinomas." Cancer Res 57(3): 426-432.
31. **Hendrich, S., H. P. Glauert, et al.** (1986). "The phenotypic stability of altered hepatic foci: effects of withdrawal and subsequent readministration of phenobarbital." Carcinogenesis 7(12): 2041-2045.
32. **Herbert, A., H. Ng, et al.** (2011). "Hypoxia regulates the production and activity of glucose transporter-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase in monocyte-derived endothelial-like cells: possible relevance to infantile haemangioma pathogenesis." Br J Dermatol 164(2): 308-315.
33. **Hixson, D. C., R. A. Faris, et al.** (1990). "An antigenic portrait of the liver during carcinogenesis." Pathobiology 58(2): 65-77.
34. **Hock, J., L. Weinmann, et al.** (2007). "Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells." EMBO Rep 8(11): 1052-1060.
35. **Hsu, I. C., R. A. Metcalf, et al.** (1991). "Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas." Nature 350(6317): 427-428.
36. **Hu, Z., R. P. Evarts, et al.** (1993). "Expression of hepatocyte growth factor and c-met genes during hepatic differentiation and liver development in the rat." Am J Pathol 142(6): 1823-1830.
37. **Jackson, F. R., S. Banfi, et al.** (1997). "A novel zinc finger-containing RNA-binding protein conserved from fruitflies to humans." Genomics 41(3): 444-452.
38. **Jee, S. H., H. Ohrr, et al.** (2004). "Cigarette smoking, alcohol drinking, hepatitis B, and risk for hepatocellular carcinoma in Korea." J Natl Cancer Inst 96(24): 1851-1856.
39. **Kar, A., N. Havlioglu, et al.** (2006). "RBM4 interacts with an intronic element and stimulates tau exon 10 inclusion." J Biol Chem 281(34): 24479-24488.
40. **Kaufmann, S. H., C. M. Ewing, et al.** (1987). "The erasable Western blot." Anal Biochem 161(1): 89-95.
41. **Kern, S. E., J. A. Pietenpol, et al.** (1992). "Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression." Science 256(5058): 827-830.
42. **Kew, M. C.** (1997). "Increasing evidence that hepatitis B virus X gene protein and p53 protein may interact in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma." Hepatology 25(4): 1037-1038.

43. **Kew, M. C. and E. W. Geddes** (1982). "Hepatocellular carcinoma in rural southern African blacks." Medicine (Baltimore) 61(2): 98-108.
44. **Kojima, S., K. Matsumoto, et al.** (2007). "LARK activates posttranscriptional expression of an essential mammalian clock protein, PERIOD1." Proc Natl Acad Sci U S A 104(6): 1859-1864.
45. **Kranenburg, O.** (2005). "The KRAS oncogene: past, present, and future." Biochim Biophys Acta 1756(2): 81-82.
46. **La Rocca, G., M. Badin, et al.** (2009). "Mechanism of growth inhibition by MicroRNA 145: the role of the IGF-I receptor signaling pathway." J Cell Physiol 220(2): 485-491.
47. **Laconi, E., A. Denda, et al.** (1993). "Studies on liver tumor promotion in the rat by orotic acid: dose and minimum exposure time required for dietary orotic acid to promote hepatocarcinogenesis." Carcinogenesis 14(9): 1771-1775.
48. **Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-685.
49. **Lai, M. C., H. W. Kuo, et al.** (2003). "A novel splicing regulator shares a nuclear import pathway with SR proteins." EMBO J 22(6): 1359-1369.
50. **Lai, M. C., R. I. Lin, et al.** (2000). "A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins." J Biol Chem 275(11): 7950-7957.
51. **Lavigueur, A., H. La Branche, et al.** (1993). "A splicing enhancer in the human fibronectin alternate ED1 exon interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding." Genes Dev 7(12A): 2405-2417.
52. **Lemire, J. M., N. Shiojiri, et al.** (1991). "Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine." Am J Pathol 139(3): 535-552.
53. **Levine, A. J.** (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." Cell 88(3): 323-331.
54. **Lin, J. C., M. Hsu, et al.** (2007). "Cell stress modulates the function of splicing regulatory protein RBM4 in translation control." Proc Natl Acad Sci U S A 104(7): 2235-2240.
55. **Lin, J. C. and W. Y. Tarn** (2005). "Exon selection in alpha-tropomyosin mRNA is regulated by the antagonistic action of RBM4 and PTB." Mol Cell Biol 25(22): 10111-10121.

56. **Lin, J. C. and W. Y. Tarn** (2009). "RNA-binding motif protein 4 translocates to cytoplasmic granules and suppresses translation via argonaute2 during muscle cell differentiation." J Biol Chem 284(50): 34658-34665.
57. **Liu, S., Y. Li, et al.** (2012). "Silencing glypican-3 expression induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells." Biochem Biophys Res Commun 419(4): 656-661.
58. **Manley, J. L. and R. Tacke** (1996). "SR proteins and splicing control." Genes Dev 10(13): 1569-1579.
59. **Markus, M. A., B. Heinrich, et al.** (2006). "WT1 interacts with the splicing protein RBM4 and regulates its ability to modulate alternative splicing in vivo." Exp Cell Res 312(17): 3379-3388.
60. **Markus, M. A. and B. J. Morris** (2006). "Lark is the splicing factor RBM4 and exhibits unique subnuclear localization properties." DNA Cell Biol 25(8): 457-464.
61. **Markus, M. A. and B. J. Morris** (2009). "RBM4: a multifunctional RNA-binding protein." Int J Biochem Cell Biol 41(4): 740-743.
62. **Mattmiller, S. A., C. M. Corl, et al.** (2011). "Glucose transporter and hypoxia-associated gene expression in the mammary gland of transition dairy cattle." J Dairy Sci 94(6): 2912-2922.
63. **Misteli, T., J. F. Caceres, et al.** (1998). "Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo." J Cell Biol 143(2): 297-307.
64. **Miyoshi, Y., A. Ando, et al.** (2002). "High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients." Clin Cancer Res 8(5): 1167-1171.
65. **Monsef, N., L. Helczynski, et al.** (2007). "Localization of immunoreactive HIF-1alpha and HIF-2alpha in neuroendocrine cells of both benign and malignant prostate glands." Prostate 67(11): 1219-1229.
66. **Murakami, Y., K. Hayashi, et al.** (1991). "Aberrations of the tumor suppressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinomas." Cancer Res 51(20): 5520-5525.
67. **Nakabayashi, H., K. Taketa, et al.** (1982). "Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium." Cancer Res 42(9): 3858-3863.
68. **Nakabayashi, H., K. Taketa, et al.** (1984). "Phenotypical stability of a human hepatoma cell line, HuH-7, in long-term culture with chemically defined medium." Gann 75(2): 151-158.

69. **Nakamura, T., T. Tokino, et al.** (1988). "Microdeletion associated with the integration process of hepatitis B virus DNA." Nucleic Acids Res 16(11): 4865-4873.
70. **Nakielny, S. and G. Dreyfuss** (1999). "Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus." Cell 99(7): 677-690.
71. **Newby, L. M. and F. R. Jackson** (1993). "A new biological rhythm mutant of *Drosophila melanogaster* that identifies a gene with an essential embryonic function." Genetics 135(4): 1077-1090.
72. **Nguyen, M. H. and E. B. Keeffe** (2002). "Screening for hepatocellular carcinoma." J Clin Gastroenterol 35(5 Suppl 2): S86-91.
73. **Oliveira, P. A., A. Colaco, et al.** (2007). "Chemical carcinogenesis." An Acad Bras Cienc 79(4): 593-616.
74. **Olsson, T., K. Bergstrom, et al.** (1982). "A sensitive method for determination of serum hemoglobin based on iso-luminol chemiluminescence." Clin Chim Acta 122(2): 125-133.
75. **Patil, M. A., M. S. Chua, et al.** (2005). "An integrated data analysis approach to characterize genes highly expressed in hepatocellular carcinoma." Oncogene 24(23): 3737-3747.
76. **Peters, L. and G. Meister** (2007). "Argonaute proteins: mediators of RNA silencing." Mol Cell 26(5): 611-623.
77. **Pfuhl, T., A. Mamiani, et al.** (2008). "The LARK/RBM4a protein is highly expressed in cerebellum as compared to cerebrum." Neurosci Lett 444(1): 11-15.
78. **Pillai, R. S., S. N. Bhattacharyya, et al.** (2007). "Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?" Trends Cell Biol 17(3): 118-126.
79. **Pitot, H. C.** (1993). "The molecular biology of carcinogenesis." Cancer 72(3 Suppl): 962-970.
80. **Pitot, H. C., Y. Dragan, et al.** (1991). "Biochemical markers associated with the stages of promotion and progression during hepatocarcinogenesis in the rat." Environ Health Perspect 93: 181-189.
81. **Powell, L. W., M. J. Burt, et al.** (1996). "Hemochromatosis: genetics and pathogenesis." Semin Liver Dis 16(1): 55-63.
82. **Pritchard-Jones, K. and L. King-Underwood** (1997). "The Wilms tumour gene WT1 in leukaemia." Leuk Lymphoma 27(3-4): 207-220.
83. **Ren, D., M. Wang, et al.** (2013). "Wild-type p53 suppresses the epithelial-mesenchymal transition and stemness in PC-3 prostate cancer cells by modulating miR145." Int J Oncol 42(4): 1473-1481.

84. **Rogler, C. E., M. Sherman, et al.** (1985). "Deletion in chromosome 11p associated with a hepatitis B integration site in hepatocellular carcinoma." Science 230(4723): 319-322.
85. **Roth, M. B., C. Murphy, et al.** (1990). "A monoclonal antibody that recognizes a phosphorylated epitope stains lampbrush chromosome loops and small granules in the amphibian germinal vesicle." J Cell Biol 111(6 Pt 1): 2217-2223.
86. **Ruiz-Opazo, N., J. Weinberger, et al.** (1985). "Comparison of alpha-tropomyosin sequences from smooth and striated muscle." Nature 315(6014): 67-70.
87. **Rustgi, V. K.** (1987). "Epidemiology of hepatocellular carcinoma." Gastroenterol Clin North Am 16(4): 545-551.
88. **Ryner, L. C., S. F. Goodwin, et al.** (1996). "Control of male sexual behavior and sexual orientation in *Drosophila* by the fruitless gene." Cell 87(6): 1079-1089.
89. **Saeter, G. and P. O. Seglen** (1990). "Cell biology of hepatocarcinogenesis." Crit Rev Oncog 1(4): 437-466.
90. **Salinovich, O. and R. C. Montelaro** (1986). "Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." Anal Biochem 156(2): 341-347.
91. **Sambrook, J., T. Maniatis, et al.** (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
92. **Samowitz, W. S., K. Curtin, et al.** (2000). "Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 9(11): 1193-1197.
93. **Schagger, H. and G. v. Jagow** (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem 166(2): 368-379.
94. **Sell, S. and H. L. Leffert** (1982). "An evaluation of cellular lineages in the pathogenesis of experimental hepatocellular carcinoma." Hepatology 2(1): 77-86.
95. **Sera, T., Y. Hiasa, et al.** (2008). "Wilms' tumour 1 gene expression is increased in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis." Eur J Cancer 44(4): 600-608.
96. **Shiojiri, N., J. M. Lemire, et al.** (1991). "Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development." Cancer Res 51(10): 2611-2620.
97. **Solt, D. B., E. Cayama, et al.** (1980). "Persistence of resistant putative preneoplastic hepatocytes induced by N-nitrosodiethylamine or N-methyl-N-nitrosourea." Cancer Res 40(4): 1112-1118.

98. **Soussi, T.** (1996). "The p53 tumour suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer." Mol Med Today 2(1): 32-37.
99. **Souza, A. F., I. S. Brum, et al.** (2013). "Reference gene for primary culture of prostate cancer cells." Mol Biol Rep 40(4): 2955-2962.
100. **Spandau, D. F. and C. H. Lee** (1988). "trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein." J Virol 62(2): 427-434.
101. **Szczyrba, J., E. Loprach, et al.** (2010). "The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing." Mol Cancer Res 8(4): 529-538.
102. **Tanaka, M., F. Katayama, et al.** (2011). "Hepatitis B and C virus infection and hepatocellular carcinoma in China: a review of epidemiology and control measures." J Epidemiol 21(6): 401-416.
103. **Towbin, H., T. Staehelin, et al.** (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A 76(9): 4350-4354.
104. **Ueda, H., S. J. Ullrich, et al.** (1995). "Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer." Nat Genet 9(1): 41-47.
105. **Wang, C., X. Wang, et al.** (2012). "Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies." Int J Cancer 130(7): 1639-1648.
106. **Wang, H. P. and C. E. Rogler** (1988). "Deletions in human chromosome arms 11p and 13q in primary hepatocellular carcinomas." Cytogenet Cell Genet 48(2): 72-78.
107. **Whitehead, T. P., L. J. Kricka, et al.** (1979). "Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory." Clin Chem 25(9): 1531-1546.
108. **Wilkens, L., C. Hammer, et al.** (2012). "Hepatocellular and cholangiolar carcinoma-derived cell lines reveal distinct sets of chromosomal imbalances." Pathobiology 79(3): 115-126.
109. **Wittekind, C., H.-J. Meyer, et al.** (2011). *TNM : Klassifikation maligner Tumoren.* Wiley-Blackwell, Weinheim.
110. **Yeh, C. T.** (2000). "Hepatitis B virus X protein: searching for a role in hepatocarcinogenesis." J Gastroenterol Hepatol 15(4): 339-341.
111. **Zahler, A. M., W. S. Lane, et al.** (1992). "SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors." Genes Dev 6(5): 837-847.
112. **Zaman, S. N., W. M. Melia, et al.** (1985). "Risk factors in development of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: prospective study of 613 patients." Lancet 1(8442): 1357-1360.

7. Appendix

Übersicht Rbm4b-Blots Teil 1

Probe	267	267	684	684	761	761
Rbm4 B						
GAPDH						
Typ	N	T	N	T	N	T

Menge (Probe/GAPDH)	0,110111	0,01570	1,31053	0,05644	0,36525	0,04513
relative Änderung		-85,74 %		-95,69 %		-87,64 %

Probe	823	823	789	789	786	786
Rbm4 B						
GAPDH						
Typ	N	T	N	T	N	T

Menge (Probe/GAPDH)	1,54807	0,30692	1,88600	0,01511	1,63836	0,01215
relative Änderung		-80,17 %		-99,20 %		-99,26 %

Probe	1052	1052	1081	1081	1104	1104
Rbm4 B						
GAPDH						
Typ	N	T	N	T	N	T

Menge (Probe/GAPDH)	0,47272	0,11294	0,24356	0,42959	1,16274	0,14377
relative Änderung		-76,11 %		+76,38%		-87,64 %

Übersicht Rbm4b-Blots Teil 2

Probe	1122	1122	1124	1124	1194	1194
Rbm4 B						
GAPDH						
Typ	N	T	N	T	N	T

Menge (Probe/GAPDH)	0,75641	0,47177	3,44966	0,04952	1,04084	0,05623
relative Änderung		-37,63 %		-98,56 %		-94,60 %

Probe	56	56	57	57	58	58
Rbm4 B						
GAPDH						
Typ	N	T	N	T	N	T

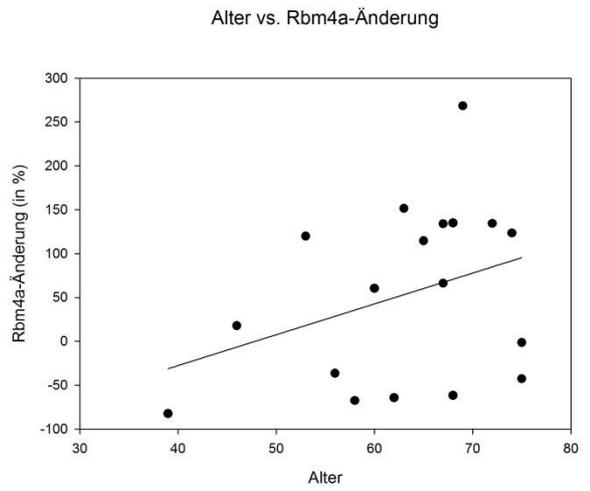
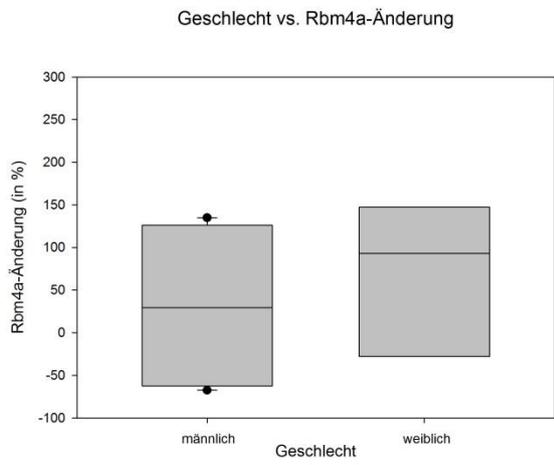
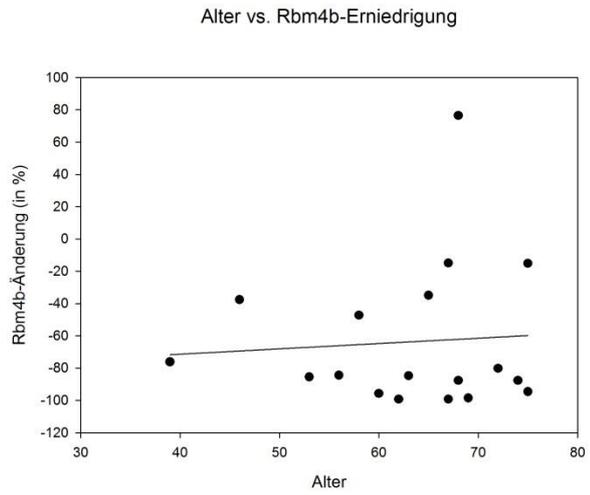
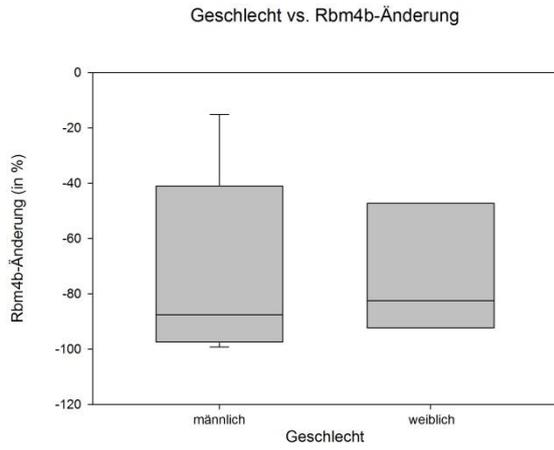
Menge (Probe/GAPDH)	0,59741	0,08667	0,54234	0,35310	0,09236	0,07853
relative Änderung		-85,49 %		-34,89 %		-14,97 %

Probe	59	59	62	62	65	65
Rbm4 B						
GAPDH						
Typ	N	T	N	T	N	T

Menge (Probe/GAPDH)	0,32793	0,27828	0,16701	0,08812	0,389311	0,06090
relative Änderung		-15,14 %		-47,24%		-84,36 %

Appendix-Tabelle 1: gemessene Intensitäten für Normal (I_N) und Tumor (I_T) -Gewebe

Probe	I_N	I_T	rA
1 – RBM4a	0,432965989	1,08869562	+151,45
1 – RBM4b	0,110111636	0,01570206	-85,74
2 – RBM4a	0,642103697	1,02996209	+60,40
2 – RBM4b	1,310534986	0,05644818	-95,69
3 – RBM4a	2,302320504	0,88063515	-61,75
3 – RBM4b	0,365255881	0,04513785	-87,64
4 – RBM4a	1,734672896	4,06687769	+134,45
4 – RBM4b	1,548073949	0,3069271	-80,17
5 – RBM4a	2,502340753	0,89060787	-64,41
5 – RBM4b	1,886000863	0,01511626	-99,20
6 – RBM4a	0,739214972	1,72937772	+133,95
6 – RBM4b	1,638361253	0,01215316	-99,26
7 – RBM4a	0,642337338	0,11302627	-82,40
7 – RBM4b	0,472724287	0,1129436	-76,11
8 – RBM4a	0,56095165	1,31781524	+134,92
8 – RBM4b	0,243562731	0,42959273	+76,38
9 – RBM4a	0,393427042	0,87921675	+123,48
9 – RBM4b	1,162745229	0,14377093	-87,64
10 – RBM4a	0,678710227	0,79880146	+17,69
10 – RBM4b	0,756412145	0,47177204	-37,63
11 – RBM4a	0,350032484	1,28930741	+268,34
11 – RBM4b	3,449661028	0,04952095	-98,56
12 – RBM4a	0,921118311	0,52737207	-42,75
12 – RBM4b	1,040843842	0,05623782	-94,60
13 – RBM4a	0,282335854	0,62091989	+119,92
13 – RBM4b	0,597411524	0,08667017	-85,49
14 – RBM4a	0,331508985	0,71128719	+114,56
14 – RBM4b	0,542349968	0,35310725	-34,89
15 – RBM4a	0,194829845	0,32387456	+66,23
15 – RBM4b	0,092362237	0,07853602	-14,97
16 – RBM4a	0,651418857	0,64208776	-1,43
16 – RBM4b	0,327935318	0,27828242	-15,14
17 – RBM4a	0,201210009	0,06539282	-67,50
17 – RBM4b	0,167012246	0,08812392	-47,24
18 – RBM4a	0,62446609	0,39667397	-36,48
18 – RBM4b	0,389311246	0,06090588	-84,36



8. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Beitrag eingereicht:

YB-1 mediated upregulation of Smad7 interferes with cytostatic TGF-beta effects in human hepatocellular carcinoma

Teng Feng^{1*}, Johanna Dzieran^{1*}, Xing Gu^{2*}, Silke Marhenke³, Arndt Vogel³, Keigo Machida⁴, Thomas S. Weiss⁵, Petra Ruemmele⁹, Otto Kollmar⁶, **Patrick Hoffmann**⁷, Friedrich Grässer⁷, Heike Allgayer⁸, Jasmin Fabian¹, Hong Lei Weng¹, Andreas Teufel¹⁰, Thorsten Maass¹⁰, Christoph Meyer¹, Ulrich Lehmann¹¹, Cheng Zhu¹², Peter R. Mertens¹², Nadja M. Meindl-Beinker^{1*}, Chun Fang Gao^{2*}, Steven Dooley^{1*}

9. Danksagung

Allen vorweg möchte ich an dieser Stelle meiner Familie für die endlose Unterstützung danken, die mir über all die Jahre zu Teil wurde. Ohne euch hätte ich niemals die Möglichkeit gehabt nach der Uni statt zu Arbeiten ins Labor zu gehen, mal ganz Abzuschalten, meinen Frust rauslassen und die zahlreichen, einsamen Wochenenden im Labor wären mir ohne telefonische Unterhaltung wie eine Ewigkeit vorgekommen. Das gilt natürlich ganz besonders dir, Sabrina!

Dann gibt's da noch so ein paar Humanbiologen: Ohne Julia Alles, Henrik Groß, Martin Hart und Jarek Szczyrba wäre ich total aufgeschmissen gewesen! Herzlichsten Dank für eure megamäßige Unterstützung, eure Geduld und vor allem euren Respekt vor dem Mediziner, der am Anfang so wirklich gar keine Ahnung von Laborarbeit hatte. Aus der Zusammenarbeit mit euch habe ich fachlich und auch persönlich viel gelernt! Der Graf verabschiedet sich mit einer Lebensweisheit: man sieht sich immer zweimal im Leben! Ich freue mich schon darauf!

Selbstverständlich möchte ich mich auch herzlich bei Prof. Dr. Friedrich Grässer für die Möglichkeit in seiner wunderbaren Arbeitsgruppe arbeiten zu dürfen und die herausragende Betreuung bedanken. Auch Frau Dr. Stefanie Barth hatte immer Zeit und ein offenes Ohr, vielen Dank dafür!

Maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und deshalb auch oft auf eigene Bedürfnisse verzichtet haben ebenso: Sabrina Coenen, Martin Parr und Kristian Radic.

Abschließend gilt mein herzlicher Dank Herrn Prof. Dr. Otto Kollmar für die Bereitstellung der Proben, Frau Dr. Elisabeth Krämer für die Klonierung der Antikörper und Herrn Robert Mullenbach für seine Hilfe bei der Aufbereitung der Proben.

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Insbesondere habe ich weder die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen noch anderen Personen unmittelbare oder mittelbare geldwerte Leistungen für Arbeiten gewährt, welche im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Homburg, den 20.10.2013

(Patrick Hoffmann)