AUS DEM LEHRSTUHL

FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE

PROF. DR. MED. OLAF ORTMANN

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Einfluss des Gens icb-1 auf das Wachstum von HEC-1B endometrialen Adenokarzinomzellen

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Vanessa Wagmüller

2021

AUS DEM LEHRSTUHL

FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE

PROF. DR. MED. OLAF ORTMANN

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Einfluss des Gens icb-1 auf das Wachstum von HEC-1B endometrialen Adenokarzinomzellen

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Vanessa Wagmüller

2021

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Oliver Treeck

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christa Büchler

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2021

Inhalt

1. Einleitung 7
1.1 Endometriumkarzinom 7
1.1.1 Epidemiologie 7
1.1.2 Risikofaktoren & protektive Faktoren 7
1.1.3 Symptome 8
1.1.4 Pathologie 8
1.1.5 Diagnostik 10
1.1.6 Stadieneinteilung 10
1.1.7 Therapie 12
1.2 Das Gen icb-1 13
1.3 Ziel der Arbeit 16
2. Methoden 18
2.1 Zellkultur 18
2.2 Aussaat 18
2.3 Transfektion 18
2.4 RNA-Isolierung 19
2.5 Photometer-Messung 20
2.6 Reverse Transkription 21
2.7 Quantitative PCR (qPCR) 21
2.8 Zellproliferationsassay 22
2.9 Überblick über den gesamten Versuchsaufbau 23
3. Materialien 25
3.1 Zelllinien 25
3.2 Zellkultur 25
3.3 Transfektion 26
3.4 RNA-Isolierung 26
3.5 Reverse Transkription 27
3.6 Quantitative PCR (qPCR) 27
3.7 Zellproliferationsassay 28
3.8 Pipettierzubehör 29
3.9 Geräte 29
4. Ergebnisse 31
4.1 Versuche zur Optimierung der Transfektionseffizienz 31
4.2 Endgültige Ergebnisse mit dem optimierten Transfektionsprotokoll 33
4.2.1 Mittlerer Knockdown der Versuchsansätze in der Übersicht 33

4.2.2 Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im zeitlichen Verlauf 35
4.2.3 Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen mit Stimulation mit E2..... 45
4.2.4 Auswertung des Effekts der Stimulation mit E2 auf das Zellwachstum der icb-1-Knockdown-Zellen..... 53
4.2.5 Untersuchung der Expression Proliferations-assoziierter Gene auf mRNA-Ebene in icb-1-Knockdown-Zellen..... 56
5. Diskussion 60
5.1 Inhibierender Einfluss von icb-1 auf das zelluläre Wachstum der Zelllinie HEC-1B..... 60
5.2 Übereinstimmung der Ergebnisse mit Erkenntnissen bei Ovarialkarzinomzellen und Brustkrebszellen..... 61
5.3 Effekt des icb-1 Knockdowns auf die Proliferation der Zellen bei Zugabe von 17-β-Östradiol 62
5.4 Analyse der Expression Proliferations-assoziierter Gene auf mRNA-Ebene bei Knockdown von icb-1 64
5.5 Experimentelle Limitationen 65
6. Zusammenfassung 65
7. Anhang 67
7.1 Abbildungsverzeichnis..... 67
7.2 Tabellenverzeichnis..... 70
7.3 Abkürzungsverzeichnis 71

1. Einleitung

1.1 Endometriumkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das mittlere Erkrankungsalter des Endometriumkarzinoms beträgt 68 Jahre. Mit höherem Alter steigt das Risiko für das Auftreten eines Endometriumkarzinoms. Demnach ist das Endometriumkarzinom eine Erkrankung der älteren Frau. Im Jahr 2016 wurden insgesamt 11090 Neuerkrankungen in Deutschland gezählt. Hieraus ergeben sich 26,6 Neuerkrankungen pro 100000 Frauen. Im selben Jahr starben 2600 Frauen an Endometriumkarzinom. Rechnet man dies wiederum in die rohe Rate um, dann entspricht dies 6,2 Todesfälle pro 100000 Frauen. Des Weiteren liegt die relative Rate des 5-Jahres-Überlebens bei 78%. Die relative Rate des 10-Jahres-Überlebens liegt schließlich nur noch bei 74%. Die Daten wurden im Wesentlichen dem Bericht des Robert Koch-Instituts entnommen [1].

1.1.2 Risikofaktoren & protektive Faktoren

Folgende Ausführungen folgen im Wesentlichen den Inhalten der aktuellen Leitlinie für das Endometriumkarzinom [2]:

Risikofaktoren für die Entstehung eines Endometriumkarzinom sind beispielsweise eine Östrogenexposition ohne Gestageneinfluss, metabolisches Syndrom, PCO-Syndrom, frühe Menarche beziehungsweise späte Menopause, das heißt eine verlängerte Lebensphase mit Menstruationsblutungen. Des Weiteren sind Nulliparität oder wenige Schwangerschaften, ein Mammakarzinom in der Eigenanamnese, die Anwendung von Tamoxifen bei Mammakarzinom und das HNPCC-Syndrom als autosomal-dominant vererbte Erkrankung ebenfalls Risikofaktoren für die Entstehung eines Endometriumkarzinoms. Hingegen wirken niedrige Östrogen- und hohe Gestagen- beziehungsweise Progesteronspiegel protektiv. Hieraus ergeben sich folgende schützende Faktoren gegen die Entstehung eines Endometriumkarzinoms:

Multiparität, Tabakkonsum, körperliche Aktivität und die Einnahme von oralen Kontrazeptiva.

1.1.3 Symptome

Postmenopausal können uterine Blutungen ein Hinweis auf ein Endometriumkarzinom sein. Prämenopausal können Metrorrhagien (azyklische Blutungen oder Dauerblutungen außerhalb der Menstruationsphase) und abnormer Fluor auf ein Endometriumkarzinom hindeuten. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer lokalen Ausbreitung per continuitatem in Vagina, Tuben und Ovar. Lymphogene und hämatogene Metastasen finden sich erst in späten Stadien. Die lymphogene Metastasierung erfolgt entlang der paraaortalen und der pelvinen Lymphknoten. Sehr selten und erst im weit fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung erfolgt die hämatogene Metastasierung in die Lunge [2].

1.1.4 Pathologie

Man kann das Endometriumkarzinom in einen östrogenabhängigen Typ (Typ-I-Karzinom) und in einen östrogenunabhängigen Typ (Typ-II-Karzinom) unterteilen. Die dualistische Betrachtungsweise geht ursprünglich auf Jan Bokhman zurück [3].

Typ-I-Karzinome sind durch ihre Abhängigkeit von Östrogen charakterisiert. Sie weisen meist eine hohe Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren auf. Sie entstehen häufig auf dem Boden einer atypischen Endometriumhyperplasie. In der Regel werden sie in einem niedrigen Stadium diagnostiziert und sind durch einen günstigen Verlauf gekennzeichnet. Der Altersgipfel liegt um die Menopause herum. Dem Typ-I-Karzinom werden die endometrioiden Adenokarzinome mit ihren Varianten und die muzinösen Adenokarzinome zugeordnet [2].

Die Typ-II-Karzinome werden nur schwach oder gar nicht durch Östrogene beeinflusst. Dies zeigt sich auch in der fehlenden oder nur schwach ausgeprägten Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren. Das Typ-II-Karzinom entsteht eher auf atrophischem Endometrium. Patientinnen mit Typ-II-Karzinom sind tendenziell älter als

die Patientinnen mit Typ-I-Karzinom. Zu den Typ-II-Karzinomen gehören das seröse und das klarzellige Adenokarzinom [2].

Die WHO-Klassifikation von 2014 [4] unterscheidet bei der Endometriumhyperplasie zwei verschiedene Subtypen: Die Endometriumhyperplasie ohne Atypien und die atypische Endometriumhyperplasie (Synonym: endometriale intraepitheliale Neoplasie=EIN). Die atypische Endometriumhyperplasie gilt nach der Klassifikation als eine Vorläuferläsion des Typ-I-Karzinoms. Die Endometriumhyperplasie ohne Atypien wird hingegen nur als Risikoerkrankung für die Entstehung eines Endometriumkarzinoms gewertet. Die genaue histologische Typisierung des Tumors ist für die Therapie und Prognose der Erkrankung von großer Bedeutung. Bei den meisten Endometriumkarzinomen handelt es sich um endometrioide Adenokarzinome. Diese gehören zu den Typ-I-Karzinomen. Histologisch kann man endometrioide Adenokarzinome, Mischformen mit plattenepithelialen Anteilen sowie seltene spezielle Typen unterscheiden. Diese werden nach ihrem Malignitätsgrad in gut differenzierte (G1), mittelgradig differenzierte (G2) und gering differenzierte (G3) Karzinome eingestuft. Die Prognose ist günstiger, je höher differenziert die Karzinome sind. Eine Übersicht über die genaue histopathologische Klassifikation befindet sich in folgender Tabelle, die der aktuellen S3-Leitlinie [2] entnommen wurde.

- Endometrioides Adenokarzinom
- Endometrioides Adenokarzinom-Varianten
    - Sekretorische Variante
    - Flimmerzellvariante
    - Villoglanduläre Variante
    - Variante mit plattenepithelialer Differenzierung
- Muzinöses Adenokarzinom
- Seröses Adenokarzinom
- Klarzelliges Adenokarzinom
- Gemischtes Karzinom
- Undifferenziertes Karzinom
    - Monomorpher Typ
    - Dedifferenzierter Typ
- Neuroendokrine Tumoren
    - Gut differenzierter neuroendokriner Tumor (Karzinoid)

– Schlecht differenziertes kleinzelliges neuroendokrines Karzinom
– Schlecht differenziertes großzelliges neuroendokrines Karzinom
• Andere Karzinome

Tabelle 1: Histopathologische Klassifikation des Endometriumkarzinoms [4], [5]

1.1.5 Diagnostik

In der aktuellen Leitlinie [2] wird derzeit kein Screening zur Früherkennung eines Endometriumkarzinoms für asymptomatische Frauen empfohlen. Dabei sind Frauen mit einem erhöhten Risiko für Endometriumkarzinom und Frauen unter Tamoxifentherapie ebenfalls eingeschlossen. Jede postmenopausale Blutung beziehungsweise jede prä- oder perimenopausale Blutungsstörung muss abgeklärt werden. Zur vollständigen Diagnostik gehört zunächst die gynäkologische Untersuchung. Hierbei wird Ursprung und Ausmaß der Blutung bestimmt. Des Weiteren kann man gegebenenfalls orientierend die Ausdehnung des Karzinoms über den Uterus hinaus beurteilen. Eine weitere wichtige diagnostische Untersuchung ist die transvaginale Sonographie. Hier können das Endometrium, der Uterus und die Adnexen näher betrachtet werden. Für die sichere Diagnose eines Endometriumkarzinoms ist die Hysteroskopie in Kombination mit fraktionierter Abrasio der Goldstandard [6], [7], [8].

1.1.6 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des Endometriumkarzinoms erfolgt nach der jeweils gültigen FIGO-/ TNM-Klassifikation. Die folgende Tabelle [9] wurde der S3-Leitlinie entnommen [2]. Das jeweilige Stadium trägt zu den weiteren Therapieentscheidungen wesentlich bei und ist daher von großer Wichtigkeit.

TNM-Kategorie	FIGO-Stadien	Definition
TX		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0		Kein Anhalt für Primärtumor
T1	I[1]	Tumor begrenzt auf Corpus uteri
T1a	IA[1]	Tumor begrenzt auf Endometrium oder infiltriert weniger als die Hälfte des Myometriums
T1b	IB	Tumor infiltriert die Hälfte oder mehr des Myometriums
T2	II	Tumor infiltriert das Stroma der Zervix, breitet sich jedoch nicht jenseits des Uterus aus
T3 und/oder N1	III	Lokale und/oder regionäre Ausbreitung wie nachfolgend beschrieben:
T3a	IIIA	Tumor befällt Serosa und/oder Adnexe (direkte Ausbreitung oder Metastasen)
T3b	IIIB	Vaginal- oder Parametriumbefall (direkte Ausbreitung oder Metastasen)
N1	IIIC	Metastasen in Becken- und/oder paraaortalen Lymphknoten[2]
	IIIC1	Metastasen in Beckenlymphknoten
	IIIIC2	Metastasen in paraaortalen Lymphknoten
T4	IVA	Tumor infiltriert Blasen- und/oder Rektumschleimhaut[3]
M1	IVB	Fernmetastasen, einschließlich intraabdomineller Metastasen (ausgenommen Metastasen in Vagina, Beckenserosa oder Adnexen, einschließlich Metastasen in inguinalen und anderen intraabdominalen Lymphknoten als paraaortalen und/oder Beckenlymphknoten) des Endometriumkarzinoms

Tabelle 2: Die neue (2010) FIGO-/ TNM-Klassifikation des Endometriumkarzinoms [9],

[1] Die alleinige Beurteilung von endozervikalen Drüsen soll als Stadium I klassifiziert werden.

[2] Eine positive Zytologie soll gesondert diagnostiziert und ohne Änderung des Stadiums dokumentiert werden.

[3] Das Vorhandensein eines bullösen Ödems genügt nicht, um einen Tumor als T4 zu klassifizieren. Infiltration der Schleimhaut von Blase oder Rektum bedarf des Nachweises durch Biopsie.

1.1.7 Therapie

Eine Endometriumhyperplasie ohne Atypien soll nach den aktuellen Leitlinien [2] beobachtet beziehungsweise konservativ behandelt werden. Eine Hysterektomie ist in diesem Fall nicht indiziert. Bei einer atypischen Endometriumhyperplasie (Synonym: endometrioide intraepitheliale Hyperplasie) ist die Therapie der Wahl die totale Hysterektomie und gegebenenfalls eine Adnexexstirpation. Bei Vorliegen eines frühen Endometriumkarzinoms soll ebenfalls eine totale Hysterektomie und beidseitige Adnexexstirpation durchgeführt werden. In folgenden Ausnahmefällen kann in diesen Situationen auch anders verfahren werden: Bei prämenopausalen Frauen können bei der Durchführung einer Hysterektomie und beidseitigen Salpingektomie die Ovarien belassen werden. Es dürfen hierbei keine Anhaltspunkte für eine hereditäre Disposition für ein Ovarialkarzinom bestehen und die Patientin muss über das bestehende Risiko aufgeklärt sein. Des Weiteren kann bei prämenopausalen Frauen mit Kinderwunsch der Uterus und die Adnexe zunächst belassen werden. Die Patientin muss jedoch darüber aufgeklärt werden, dass die totale Hysterektomie die empfohlene und zur Heilung führende Therapie ist. Zudem muss die Patientin mit einer engmaschigen Überwachung einverstanden sein. Nach Erfüllung beziehungsweise abgeschlossenem Kinderwunsch sollte dann schließlich die totale Hysterektomie durchgeführt werden. Bei fortgeschrittenem Endometriumkarzinom (inklusive Karzinosarkomen) kann eine operative Tumorreduktion mit dem Ziel der makroskopischen Tumorfreiheit durchgeführt werden. Die Durchführung einer zusätzlichen Strahlentherapie und/oder medikamentösen Therapie richtet sich nach dem jeweiligen Tumorstadium und dem persönlichen Krankheitsverlauf der Patientin. Für die genauen Anwendungsrichtlinien dieser weiteren Therapiemodalitäten wird auf die aktuelle Leitlinie verwiesen [2].

1.2 Das Gen icb-1

Das menschliche Gen icb-1 liegt auf dem Chromosom 1 als open reading frame 38 und wird von daher auch C1ORF38 genannt. Die Abkürzung icb-1 steht für induced by contact to basement membrane, da bei der erstmaligen Beschreibung des Gens eine erhöhte Expression von icb-1 in endometrialen Adenokarzinomzellen bei Kontakt mit künstlicher Basalmembran festgestellt wurde. Hiervon leitet sich oben genannte Bezeichnung ab [10]. Das Gen icb-1 spielt nicht nur bei zellulären Differenzierungsprozessen in endometrialen Adenokarzinomzellen eine Rolle, sondern auch bei Leukämiezellen. Man konnte eine erhöhte Expression von icb-1 nachweisen, wenn Leukämiezellen mit DMSO, all-trans Retinolsäure oder Vitamin D3 in Kontakt gebracht wurden [11]. Weitere Forschungsarbeiten [12] konnten das Gen icb-1 in eine Genfamilie einordnen, die aus insgesamt fünf Genen besteht. Gemeinsames Merkmal dieser Genfamilie ist die globuläre Domäne CABIT. Diese enthält ein Cystein-Motiv. Ein weiteres Mitglied dieser Genfamilie ist THEMIS1 (thymocyte selection associated family member 1). THEMIS1 spielt eine Rolle bei der Thymopoese. Es wurde gezeigt, dass THEMIS1 die normale Entwicklung von Thymozyten unterstützt. THEMIS1 verhindert die Apoptose während der positiven Selektion der Thymozyten [12]. Als Mitglied dieser Genfamilie wird icb-1 auch als THEMIS2 (thymocyte selection associated family member 2) bezeichnet. In dieser Arbeit wird die Bezeichnung icb-1 verwendet. THEMIS2/icb-1 scheint außerdem eine Funktion als Kontrollpunkt in Makrophagen bei der inflammatorischen Reaktion auszuüben. Denn es wurde nachgewiesen, dass icb-1 Einfluss auf die LPS-induzierte TNF-Produktion nimmt [13]. In bisherigen Studien zu icb-1 wurde außerdem eine Funktion als Tumorsuppressor festgestellt. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass der Verlust von icb-1 als Tumorsuppressor zu einer relativen Resistenz gegenüber apoptotisch-wirksamen Medikamenten in Mammakarzinomzellen führt [14].

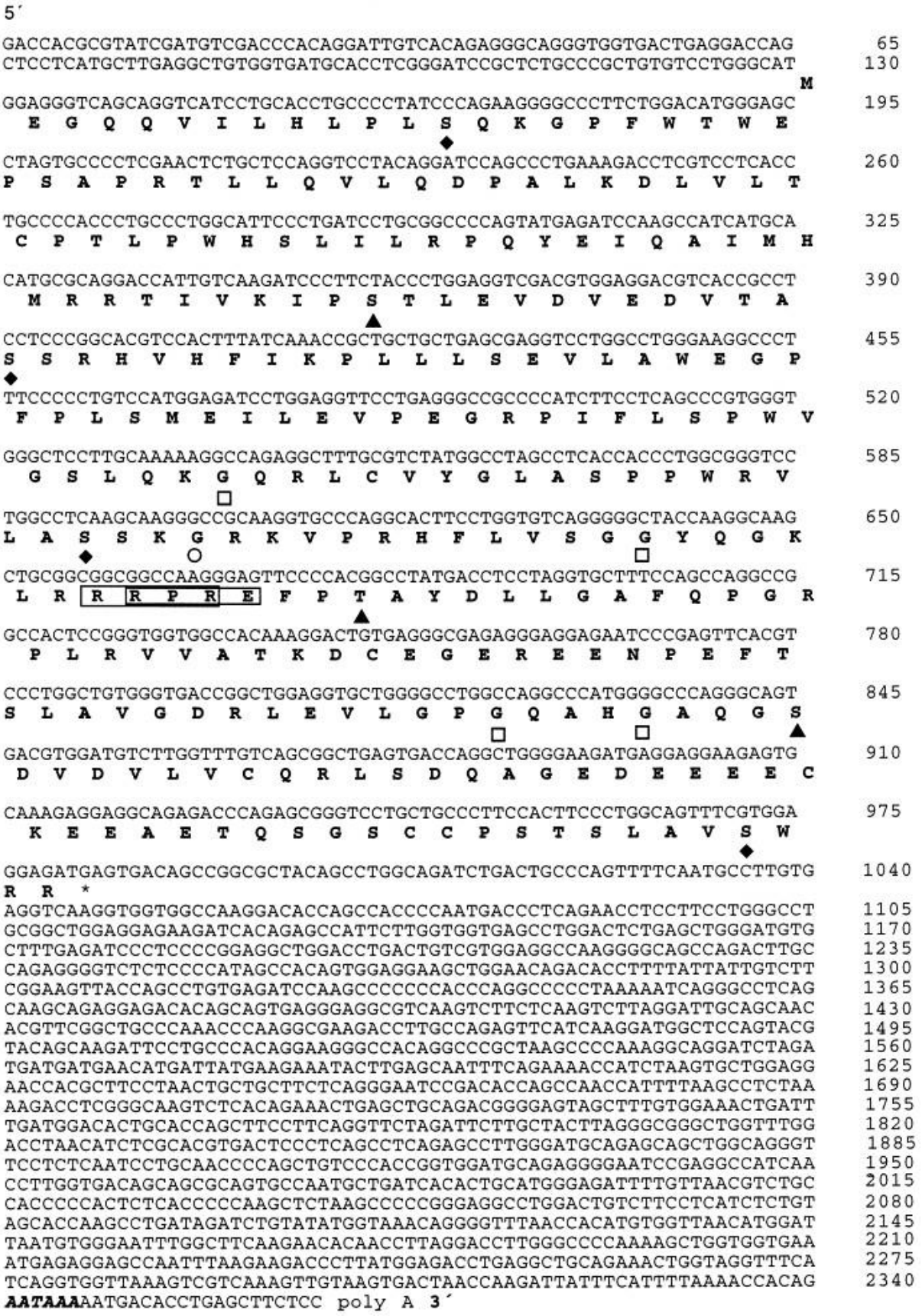


Abbildung 1: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der cDNA des humanen Gens icb-1, Raute: Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase C, Dreieck:

Phosphorylierungsstelle für die Caseinkinase II, Quadrat: N-Myristoylierungsstelle, Kreis: Amidierungsstelle, Kasten: Zwei 4-gliedrige Nuclear-Targeting Patterns, Fett: Polyadenylierungssignal [10]

Bei weiteren Untersuchungen ergab sich, dass die Expression von icb-1 das Wachstum von ovariellen Krebszellen inhibiert. Im Umkehrschluss führt der Verlust der Expression von icb-1 zu einer beschleunigten Proliferation in Ovarialkarzinomzelllinien [15]. Zudem besitzt icb-1 ein estrogen response element (ERE) in seiner Promoterregion. Dies führte zur Annahme, dass icb-1 durch Östrogene reguliert wird. Daraufhin untersuchte man, ob die Expression von icb-1 in Mammakarzinom- und Ovarialkarzinomzellen durch 17-β-Östradiol beeinflusst wird. Die Ergebnisse dieser Versuche haben eine Abhängigkeit der Transkriptionsrate von icb-1 von Östrogenen gezeigt [16]. In einer weiteren Studie wurde die Rolle von icb-1 bei der Regulation der Proliferation in gynäkologischen Krebszellen untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass icb-1 eine antagonistische Wirkung auf die Östrogenempfindlichkeit einer Krebszelle hat. Das Gen icb-1 verhindert die Östrogen-vermittelte Proliferation in der Krebszelle. Dies geschieht vermutlich über eine Verringerung der Expression von ER α (estrogen receptor α) und eine Erhöhung der Expression von ER β (estrogen receptor β) [17]. Des Weiteren fand man heraus, dass die Expression von icb-1 in Mammakarzinom- und Ovarialkarzinomzellen durch Interferon-γ induziert wird. Das Gen icb-1 inhibiert wiederum die Effekte dieses Zytokins auf die Zellen [18]. Schließlich wurde mit Hilfe von zwei Fall-Kontroll-Studien die Auswirkung von single nucleotide polymorphism (SNP) in icb-1 auf die Vulnerabilität für Ovarial- und Mammakarzinom untersucht. Hierfür wurde jeweils eine Gruppe von Patientinnen mit Brust- oder Eierstockkrebs (Fälle) einer gesunden Gruppe von Frauen gegenübergestellt. Hierbei zeigte sich, dass homozygote oder heterozygote Trägerinnen des single nucleotide polymorphism (SNP) rs1467465 sich häufiger in der Gruppe der Krebspatientinnen befanden. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass das single nucleotide polymorphism (SNP) rs 1467465 von icb-1 zu einer erhöhten Anfälligkeit sowohl für Mammakarzinom als auch für Ovarialkarzinom führen kann [19], [20]. Der Knockdown von icb-1 in Mammakarzinom- und Endometriumkarzinomzellen inhibiert die Hochregulierung der Expression von E-Cadherin durch Vitamin D3 und all-trans Retinolsäure. In Mammakarzinomzellen wird zudem die Erhöhung der Expression von

estrogen β receptor und Lactoferrin durch Vitamin D3 oder all-trans Retinolsäure inhibiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass icb-1 ein Mediator von Differenzierungssignalen in Mammakarzinomzellen ist [21]. In einer anderen Studie wurde die Expression von icb-1 in endometrialen Adenokarzinomzellen im Vergleich zu normalen, gesunden Endometriumzellen betrachtet. Dabei stellte sich heraus, dass die Expression von icb-1 in endometrialen Adenokarzinomzellen signifikant höher ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine positive Korrelation zwischen der Expression von icb-1 und der Expression von c-erb (HER2) besteht [22].

1.3 Ziel der Arbeit

Wie bereits mehrere Arbeiten der Forschungsgruppe Molekulare Onkologie von Herrn Prof. Dr. Treeck zeigten, scheint das humane Gen icb-1 Einfluss auf die Differenzierung, Proliferation, Apoptose und Progression gynäkologischer Tumore zu nehmen. In dieser Dissertation sollen die Erkenntnisse zu dem Gen icb-1, insbesondere in endometrialen Adenokarzinomzellen, weiter ausgebaut werden. Ein weitreichendes und tiefgehendes Verständnis der molekularen Mechanismen bei der Proliferation von malignen Zellen könnte langfristig zu einer verbesserten und gezielteren Diagnostik und Therapie bei Endometriumkarzinom beitragen.

Ziel der Arbeit war es ein besseres Verständnis für die Rolle von icb-1 in endometrialen Adenokarzinomzellen zu gewinnen. Dabei wurde insbesondere die Bedeutung des Rezeptors für das Wachstumsverhalten dieser Zellen untersucht. Die Hypothese hierbei war, dass icb-1 als Tumorsuppressorgen in endometrialen Adenokarzinomzellen fungiert. Das heißt, dass der Verlust dieses Gens zu einer gesteigerten Proliferation bei endometrialen Adenokarzinomzellen führen würde. Diese Hypothese sollte in dieser Arbeit verifiziert werden. Zudem sollten in dieser Arbeit die genauen molekularen Mechanismen der Effekte von icb-1 auf die Proliferation untersucht werden. Dabei sollte die Änderung der Expression verschiedener nachgeschalteter Gene, die bei der Zellproliferation eine Rolle spielen, untersucht werden. Eine Veränderung der Expression dieser Gene nach Knockdown von icb-1 gibt Rückschluss auf den Effekt von icb-1 bei der Proliferation. Zudem sollte

untersucht werden, welche Auswirkung icb-1 auf die Östrogenempfindlichkeit endometrialer Adenokarzinomzellen hat und ob darüber hinaus eine Östrogen-getriggerte Änderung des Wachstumsverhaltens endometrialer Adenokarzinomzellen stattfindet.

Die experimentelle Strategie dieser Arbeit gestaltete sich dabei folgendermaßen: Die Zellen wurden mit einer spezifischen siRNA transfiziert. Die siRNA bildet mit verschiedenen Proteinen einen sogenannten RNA-induced silencing complex (RISC). Der doppelsträngige RISC-Komplex wird ATP-abhängig entwunden. Dann kann das RISC sequenzspezifisch an seine komplementäre mRNA binden. Dadurch wird der Abbau dieser komplementären mRNA eingeleitet. So sollte ein Knockdown der Expression von icb-1 auf ≤ 20 % erreicht werden. Dem wurden Zellen, die mit einer negativen Kontroll-siRNA transfiziert wurden, gegenübergestellt. Der Erfolg und Zeitverlauf der Transfektion wurde zum einen optisch und zum anderen auf mRNA-Ebene kontrolliert. Nach Etablierung eines reproduzierbaren Knockdowns wurde an die Transfektion ein Proliferationsassay angehängt. Hier wurde der Effekt des icb-1 Knockdowns auf die relative Zahl viabler Zellen 4 bis 7 Tage nach der Transfektion mit Hilfe eines CTB-Assays untersucht (CellTiter-Blue® Kit, Promega). Außerdem sollte die Rolle von icb-1 in der östrogenabhängigen Proliferation der endometrialen Adenokarzinomzellen untersucht werden. Hierzu wurde dieselbe experimentelle Strategie mit zusätzlicher Zugabe von Östrogenen angewendet. Schließlich wurde die Expression verschiedener Proliferations-assoziierter Gene in den icb-1-Knockdown-Zellen auf mRNA-Ebene untersucht.

2. Methoden

2.1 Zellkultur

Die Zelllinie HEC-1B stammte von der American Type Culture Collection (ATCC). Die Zelllinie HEC-1B wurde in Phenolrot-freiem DMEM (engl.= Dulbecco's modified Eagle's medium) mit 10% FKS, 100mM Natriumpyruvat, 200mM L-Glutamin und Insulin kultiviert. Je nach Bedarf und Versuchsplanung wurden die Zellen mindestens einmal pro Woche gesplittet. Darüber hinaus wurde das Nährmedium zusätzlich einmal wöchentlich gewechselt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (T75) bei 37 °C und 5% CO_2 in einem feuchten Brutschrank kultiviert.

2.2 Aussaat

Bei der Zelllinie HEC-1B wurden 350000 Zellen pro 6-Well-Platte ausgesät. Somit wurde 24h nach der Aussaat eine Konfluenz der Zellen von etwa 70-85% erzielt. Die Zellen wurden mit Accutase aus der Zellkulturflasche gelöst. Für die Aussaat wurde oben beschriebenes Nährmedium verwendet. Die Auszählung der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Hämocytometers.

2.3 Transfektion

Für die Herunterregulierung der Expression von icb-1 wurden drei verschiedene synthetische siRNAs verwendet. Die siRNAs wurden durch die Transfektion in das Zytoplasma eingeschleust. Dort wird die doppelsträngige siRNA in einen Komplex aus mehreren Proteinen eingebaut, den man RISC (RNA-inducing silencing complex) nennt. Der RISC-Komplex entwindet den RNA-Doppelstrang und spaltet den zur Ziel-mRNA homologen RNA-Einzelstrang. Der RNA-Einzelstrang, der komplementär zur Ziel-mRNA ist, führt zu der gewünschten Downregulation von icb-1. Zunächst wurden die verschiedenen Versuchsparameter in Vorversuchen optimiert und angepasst. Zum einen wurde die Zellzahl bei der Aussaat variiert und zum anderen wurden drei

verschiedene Transfektionsreagenzien verwendet. Dabei handelte es sich um Lipofectamine, SiLentFect und TransFectin. Die Aussaat von 350000 Zellen pro 6-Well-Platte stellte sich als geeignete Zellzahl für die Transfektion heraus. TransFectin und SiLentFect erzielten einen geeigneten Knockdown auf ≤ 20%. Die Zellen wurden 24h vor der Transfektion auf 6-Well-Platten ausgesät. Die Konfluenz wurde direkt vor der Transfektion mikroskopisch bestimmt und betrug im Mittel 70-85%.

Der Versuchsansatz gestaltete sich folgendermaßen: Zwei 6-Well-Platten wurden mit einer Mischung aus drei verschiedenen siRNAs (je 5µM) transfiziert. Demgegenüber wurden zwei 6-Well-Platten mit einer negativen Kontroll-siRNA transfiziert. So konnte man den Knockdown über zwei Zeitpunkte nachweisen, nämlich 72h beziehungsweise 96h nach der Transfektion. Außerdem wurde noch ein weiterer Ansatz mit GFP transfiziert. Die Endkonzentration auf der 6-Well-Platte betrug 5nM pro siRNA und 15nM bei der negativen Kontroll-siRNA. 24h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. 48h und 72h nach der Transfektion wurde die 6-Well-Platte, die mit GFP transfiziert wurde, mikroskopiert. Dies diente der optischen Kontrolle des Erfolgs der Transfektion.

2.4 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde nach dem folgenden allgemeinen Prinzip durchgeführt:

Die Zellen wurden mit Hilfe eines GITC-haltigen Puffers (RLT-Puffer) lysiert. Das Lysat wurde homogenisiert, um die genomische DNA abzutrennen und die Viskosität zu reduzieren. Zugabe von Ethanol ermöglichte die Bindung der RNA an die RNeasy MinElute Spin-Säule. Mittels Verdauung durch DNase auf der Säule wurde die DNA eliminiert. Anschließend wurden durch mehrere Waschschritte sonstige Kontaminationen beziehungsweise Zellreste entfernt. Letztlich wurde die RNA mit Wasser von der Säule eluiert.

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der durchgeführten Methode zur RNA-Isolierung detaillierter erläutert:

Zum jeweilig entsprechenden Zeitpunkt, das heißt nach 72h beziehungsweise nach 96h wurde jeweils 350µl RLT-Puffer auf die 6-Well-Platten gegeben und anschließend

bei -80°C eingefroren. Vor Gebrauch wurden 10µl ß-Mercaptoethanol zu je 1ml RLT-Puffer hinzugefügt. Die Zellpellets wurden zu einem späteren Zeitpunkt dann bei Raumtemperatur unter dem Abzug aufgetaut. Das Lysat wurde in Eppendorf-Cups überführt und anschließend gründlich gevortext. Dann wurden 350µl 70%iger Ethanol hinzugefügt und durch Pipettieren vermischt. Nun wurde das homogenisierte Lysat in eine RNeasy MinElute Spin-Säule überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 10000 Umdrehungen pro Minute für 30 Sekunden. Der Überstand wurde verworfen. Danach wurden 350µl RW1-Puffer auf die Säule pipettiert. Es wurde erneut bei 10000 Umdrehungen pro Minute für 30 Sekunden zentrifugiert. Für den folgenden Schritt wurde eine Mischung aus 10µl der DNase I-Stammlösung und 70µl RDD-Puffer hergestellt und direkt auf die RNeasy MinElute Silikagel-Membran pipettiert, um die vollständige Verdauung durch DNase zu gewährleisten. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 350µl RW1-Puffer zugegeben und erneut bei 10000 Umdrehungen pro Minute für 30 Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurden 500µl RPE-Puffer zugegeben und nochmals bei 10000 Umdrehungen pro Minute für 30 Sekunden zentrifugiert. Danach wurden 500µl 80%iger Ethanol auf die Säule pipettiert. Dann wurde wiederum bei 10000 Umdrehungen für 2 Minuten zentrifugiert. Schließlich folgte nochmal eine Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 5 Minuten. Abschließend wurde die RNA mit 25µl H_2O eluiert.

2.5 Photometer-Messung

Nach der RNA-Isolierung wurde die Konzentration der isolierten RNA bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm. Die Konzentration der RNA errechnet sich aus der optischen Dichte bei 260nm, der Verdünnung und dem RNA-spezifischen Multiplikationsfaktor. Zusätzlich wurde noch das Verhältnis der optischen Dichte bei 260nm beziehungsweise 280nm bestimmt, um den Reinheitsgrad der RNA zu ermitteln. Konzentrationen über 1000ng/ml wurden anschließend verdünnt.

2.6 Reverse Transkription

Aus der gewonnenen RNA wurde nun cDNA synthetisiert. Die gesamte RNA wurde mit Hilfe einer reversen Transkriptase, random primer und Nukleotiden in cDNA übersetzt. Zunächst wurden 1µg RNA, 100ng random primer und Wasser für 5 Minuten bei 65 °C im Thermocycler inkubiert. Diese erste Inkubation diente der Aufschmelzung der Sekundärstrukturen der RNA. Während der Abkühlung auf Raumtemperatur hybridisierten die random primer mit der RNA. Dann gab man einen Mix aus Puffer, Nukleotiden, RNase-Inhibitoren und Reverse Transkriptase zu dem Versuchsansatz und inkubierte für 10 Minuten bei 25 °C, dann für 60 Minuten bei 48 °C und schließlich für 15 Minuten bei 70 °C. Für die Herstellung der cDNA wurde das Affinity Script Multiple Temperature cDNA Synthese Kit von Agilent Technologies verwendet.

2.7 Quantitative PCR (qPCR)

Aus der vorangegangenen reversen Transkription erhielt man 10µl cDNA. Die cDNA wurde zunächst 1:5 verdünnt. Die qPCR erlaubt die Quantifizierung der zu bestimmenden Probe [23], [24], [25]. Hierbei wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I eingesetzt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert sequenzunspezifisch mit der dsDNA, dadurch steigt die Fluoreszenz des Farbstoffs an. Die Fluoreszenz wird nach jedem einzelnen Reaktionszyklus gemessen. Die Fluoreszenzintensität ist in jedem Zyklus direkt proportional zur Menge an gebildetem PCR-Produkt, was einen Rückschluss auf die Menge der eingesetzten Nukleinsäure erlaubt. Zunächst ist die Fluoreszenz noch gering. In den folgenden Amplifikationszyklen steigt die Fluoreszenz bis ein definierter Schwellenwert (CT) erreicht wird. Der Schwellenwert (CT) definiert den Zyklus, indem erstmals ein signifikant erhöhtes Fluoreszenzsignal vor dem unspezifischen Hintergrund messbar ist. Proben mit einer höheren Ausgangsmenge erreichen schon nach wenigen Zyklen den Schwellenwert (CT). Proben mit einer geringeren Ausgangsmenge hingegen erreichen erst später den Schwellenwert (CT). Schließlich wurde nach der qPCR noch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dafür wurde die DNA durch kontinuierliche und langsame Erhitzung aufgeschmolzen. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und es ändert sich die Fluoreszenz. Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse konnte die Spezifität des Assays verifiziert werden.

Die qPCR umfasste 40 Amplifikationszyklen. Ein Amplifikationszyklus bestand aus drei Schritten. Zuerst wurde das Reaktionsgemisch auf 95 °C für 15 Sekunden erhitzt. Dieser Schritt diente der Denaturierung. Es lagen nun zwei getrennte DNA-Einzelstränge vor. Im zweiten Schritt wurde die Temperatur auf 60 °C für 10 Sekunden gebracht. Hierbei kam es nun zum primer annealing. Es wurden jeweils zwei Primerpaare hinzugegeben. Zum einen zwei Primer für die ß-Actin-Sequenz und zum anderen die beiden Primer für das icb-1-Gen. Im letzten Amplifikationszyklus lag die Temperatur für 15 Sekunden bei 72 °C. Der parallele Ansatz mit ß-Actin diente als Referenz. ß-Actin eignete sich aufgrund der konstanten Expression als Referenz. Die Ergebnisse der qPCR wurden schließlich mit der DDCT Methode [26] analysiert. Hierbei wurde zunächst die Differenz zwischen Schwellenwert (CT) der zu bestimmenden Probe und der Referenz berechnet. Das hieraus resultierende Ergebnis wurde mit den anderen Proben verglichen.

2.8 Zellproliferationsassay

Die transfizierten Zellen wurden 24h nach der Transfektion auf 96-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden mit Hilfe von Accutase von den 6-Well-Platten abgelöst. Die transfizierten Zellen wurden in einem Sechsfachansatz auf 96-Well-Platten ausgesät. Die ausgesäte Zellzahl wurde variiert. Es wurden 100, 200 oder 800 Zellen pro 96-Well-Platte ausgesät. Die Messung erfolgte an Tag 0, 3, 4, 5, 6. Die Messung an Tag 0 erfolgte 3h bis 4h nach der Aussaat, um die Adhäsion der Zellen auf der 96-Well-Platte zu gewährleisten. Für die Messung wurde ein fluoreszierender Farbstoff auf die Zellen gegeben (CellTiter-Blue® von Promega). Der Test basiert auf der Theorie, dass lebende Zellen über einen intakten und aktiven Metabolismus verfügen. Tote Zellen hingegen verlieren schnell ihre metabolische Kapazität. Lebende Zellen haben von daher die Fähigkeit einen eingebrachten Redox-Farbstoff in ein fluoreszierendes Endprodukt umzuwandeln. In toten Zellen geschieht dies nicht und deshalb wird kein fluoreszierendes Signal generiert. Bei CellTiter-Blue® von Promega handelt es sich um Resazurin das in Resofurin umgewandelt wird. Die Anzahl lebender Zellen kann somit in einem Fluorometer abgeschätzt werden [27]. Schließlich kann das Wachstum der Zellen über die fünf Zeitpunkte im Vergleich zur Kontrolle betrachtet

werden. Darüber hinaus wurde jeweils ein paralleler Ansatz ausgesät, der mit einem Mix aus drei verschiedenen E2 stimuliert wurde.

2.9 Überblick über den gesamten Versuchsaufbau

Die Transfektions- und Proliferationsexperimente haben sich folgendermaßen gestaltet: Zu Beginn jeder Versuchsreihe wurde ein Teil der Zellen der Zelllinie HEC-1B mit icb-1-siRNA und der andere Teil mit einer Kontroll-siRNA transfiziert. Für das *gene silencing* von icb-1 wurde eine Kombination aus drei verschiedenen siRNA-Sequenzen verwendet. Bei allen Versuchsreihen wurde die gleiche Konzentration von siRNA und Kontroll-siRNA eingesetzt. Dieser Versuchsparameter blieb demnach in dieser Dissertation immer gleich. Als Transfektionsreagenz zum Einschleusen der siRNA in die Zelle wurde hingegen entweder SiLentFect oder TransFectin eingesetzt. Letztlich wurde TransFectin als Transfektionsreagenz für die endgültigen Versuchsreihen festgelegt. Zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (72h, 96h) nach Transfektion wurde die Reduktion der Genexpression auf mRNA-Ebene mit Hilfe von reverser Transkription und anschließender qPCR quantifiziert. Dies wird im Folgenden mit Knockdown bezeichnet und in Prozent der verbleibenden Genexpression angegeben. Ein suffizienter Knockdown wurde als eine Reduktion der Expression des Gens auf ≤ 20% festgelegt.

Pro Versuchsreihe wurden nach Transfektion fünf 96-Well-Platten vorbereitet, die das Wachstum der Zellen der Zelllinie HEC-1B über eine Woche abbilden sollten. Mit Hilfe des CellTiter-Blue® Cell Viability Assay von Promega (Abkürzung „CTB“) erfolgte die fluorometrische Bestimmung der Zellzahl an Tag 0, 3, 4, 5 und 6. Je eine der 96-Well-Platten repräsentierte dabei einen Tag in der Wachstumskurve und wurde an dem entsprechenden Tag nach Aussaat vermessen. Auf jeder dieser fünf 96-Well-Platten wurden zum einem sechs Wells mit Zellen, die mit der icb-1-siRNA transfiziert wurden, und ebenso viele Wells mit Zellen, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden, besät. Bei den einzelnen Versuchsansätzen wurde die Zellzahl für die Aussaat am Tag 0 variiert, um die optimalen Wachstumsbedingungen für die Zelllinie herauszufinden. Es wurde hierbei zwischen einer Zellzahl an Tag 0 von 100, 200 und 800 variiert. Es erfolgte in dieser Dissertation keine Festlegung auf eine Zellzahl, sondern es wurden diese drei Zellzahlen beibehalten. Zudem wurden weitere 12 Platten mit Nährmedium

befüllt, um später den fluorometrischen Effekt der Nährflüssigkeit rausrechnen zu können. An Tag 0 wurde dann eine der fünf Platten mit CTB vermessen und dann anschließend verworfen. Anschließend wurde an Tag 3, Tag 4, Tag 5 und Tag 6 ebenso verfahren: eine der 96-Well-Platten wurde mit Hilfe von CTB vermessen und danach verworfen. Schließlich wurde ein paralleler Versuchsansatz mit identischem Aufbau durchgeführt mit zusätzlicher Zugabe von 17-β-Östradiol (E2), um zusätzlich den Einfluss von E2 auf das Wachstum der Zellen untersuchen zu können.

Zur Veranschaulichung des Versuchsaufbaus auf einer 96-Well-Platte wurde diese im Folgenden graphisch dargestellt:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	siRNA	BLANK	cosiRNA	BLANK								
B	siRNA	BLANK	cosiRNA	BLANK								
C	siRNA	BLANK	cosiRNA	BLANK								
D	siRNA	BLANK	cosiRNA	BLANK								
E	siRNA	BLANK	cosiRNA	BLANK								
F	siRNA	BLANK	cosiRNA	BLANK								
G												
H												

Abbildung 2: schematische Darstellung einer 96-Well-Platte und die Systematik der Anordnung der Aussaat der unterschiedlich transfizierten Zellen und des Blanks auf der 96-Well-Platte

Legende:

siRNA = Aussaat einer definierten Zellzahl von icb-1-siRNA transfizierten Zellen (wie oben bereits erwähnt wurde bei den verschiedenen Versuchsreihen die Zellzahl zwischen 800, 200 und 100 variiert)

cosiRNA = Aussaat einer definierten Zellzahl einer Negativkontrolle (die ausgesäte Zellzahl gleicht der, der siRNA-transfizierten Zellen, um gleiche Startbedingungen zu haben)

BLANK = die Platte wurde nur mit dem Nährmedium befüllt, um später die Hintergrundfluoreszenz herausrechnen zu können

3. Materialien

3.1 Zelllinien

HEC-1B	American Type Culture Collection ATCC® (Manassas, VA, USA)

3.2 Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
L-Glutamine solution	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
Accutase® solution	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
Fetal Bovine Serum	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
Insulin solution human	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
CELLSTAR® CELL CULTURE FLASKS, Gewebekulturflasche 75cm^2	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Gewebekulturplatten (6 Well, 96 Well)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Sodium pyruvate solution	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

3.3 Transfektion

s18155 SIL. SEL. siRNA (5nM) s18156 SIL. SEL. siRNA (5nM) s18157 SIL. SEL. siRNA (5nM) Bestellnummer: 4392420, THEMSIS2 siRNA	ThermoFisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Silencer® Negative Control #1 siRNA Bestellnummer: AM_4611	ThermoFisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Opti-MEM® (1x)	ThermoFisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
TransFectin™ Lipid Reagent	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
siLentFect™ Lipid	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Lipofectamine® RNAiMAX	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
GFP	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
ß-Actin siRNA Bestellnummer: AM_4607	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Wasser, Bio-Science Grade	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

3.4 RNA-Isolierung

RNeasy® Micro Kit	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
Ethanol ROTIPURAN® ≥ 99,8%, p.a.	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

3.5 Reverse Transkription

Affinity Script Multiple Temperature cDNA Synthese Kit	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)

3.6 Quantitative PCR (qPCR)

LightCycler® FastStart DNA Master SYBRGreen I	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany)
LightCycler® Capillaries (20µl)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany)
Primer ß-Actin 1 CTTCCTTCCTGGGCATGGAGT (Sequenz 5'->3')	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer ß-Actin 2 CAGGAGGAGCAATGATCTTGATCTTC (Sequenz 5'->3')	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer icb 1/2 F TCGAGGGCTCCATCTATGA (Sequenz 5'->3')	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer icb 2/3 R GAAGTAGCCCTGGAAGTTGG (Sequenz 5'->3')	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer CYC1 CTGGAGGTCTGCGAGGAA (Sequenz 5'->3')	Metabion international AG (Martinsried, Deutschland)
Primer CYC2 GGGGATGGTCTCCTTCATCT (Sequenz 5'->3')	Metabion international AG (Martinsried, Deutschland)
Primer CYCE1 GGAACCACAGATGAGGTCCAT (Sequenz 5'->3')	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)

Primer CYCE2 AGATTTCCTCAAGTTTGGAAGCA (Sequenz 5‘->3‘)	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer CYCA1 CTGCTGCTATGCTGTTAGCC (Sequenz 5‘->3‘)	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer CYCA2 TGTTGGAGCAGCTAAGTCAAAA (Sequenz 5‘->3‘)	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer Ki-67_for CAGTTCCACAAATCCAACACA (Sequenz 5‘->3‘)	Metabion international AG (Martinsried, Deutschland)
Primer Ki-67_rev CTTTCATTTTCATACCTGAAGGAAC (Sequenz 5‘->3‘)	Metabion international AG (Martinsried, Deutschland)
Primer ERβ1 fw neu CAGGCATGCGAGTAACAAGGGC (Sequenz 5‘->3‘)	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer ERβ1 rev neu GACTTGCACCCGCGAAGCAC (Sequenz 5‘->3‘)	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)

3.7 Zellproliferationsassay

CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega (Madison, WI, USA)
Serum Replacement 2 (50x)	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
17-ß-Östradiol (E2)	Gemisch aus 3 verschiedenen E2 (gelöst in H_20) Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

3.8 Pipettierzubehör

Aspirationspipette	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettierhilfe accu-jet ®	Brand (Wertheim, Deutschland)
Manuelle Mikropipetten (10µl, 20µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Messpipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Biosphere® Filtertip (20µl, 100µl, 1000µl)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Quality 'Tips 1250µl extra long	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Combitips advanced® (1,0 ml und 5,0 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße 1,5 ml, farblos	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf, Deutschland)
CELLSTAR® TUBES Falcon (50 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
PCR SingleCap 8er-SoftStrips, 0,2 ml, farblos	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf, Deutschland)

3.9 Geräte

UV-Photometer GeneRay	Biometra® (Göttingen, Germany)
Light Cycler 2.0 PCR Device	Biometra® (Göttingen, Germany)
Wallac 1420 multilabel counter	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany)

Zentrifuge Biofuge Pico	PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Wallac Oy (Turku, Finnland)
Sterilbank HERA safe	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
HERA cell 150 CO_2 Inkubator	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Wasserbad	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)
Thermocycler T Gradient 96	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Multifuge 1 S-R	Biometra® (Göttingen, Deutschland)

4. Ergebnisse

4.1 Versuche zur Optimierung der Transfektionseffizienz

Zuerst wurde der icb-1-siRNA vermittelte Knockdown optimiert. Hierfür wurde zum einen zunächst ein für HEC-1B Zellen am besten geeignetes Transfektionsreagenz ermittelt. Die ersten Transfektionsexperimente wurden mit drei Transfektionsreagenzien durchgeführt: SiLentFect, Lipofectamine und TransFectin. Mit Lipofectamine wurde kein hinreichender Knockdown erzielt und von daher ausgeschlossen. Die Transfektionen mit SiLentFect und TransFectin ergaben eine suffiziente Reduktion der Expression von icb-1, jedoch war der erzielte Knockdown mit Hilfe von SiLentFect nicht stabil reproduzierbar. Es wurden dennoch CTB-Assays mit den Zellen durchgeführt, die mit SiLentFect transfiziert wurden. Dies führte jedoch zu keinen signifikanten Ergebnissen, was auf die ineffiziente Transfektion der Zellen zurückgeführt wurde. Die Ergebnisse dieser Versuche werden nachfolgend kurz skizziert.

Aussaat von 800 Zellen pro Well und SiLentFect als verwendetes Transfektionsreagenz:

Die Ansätze mit 800 Zellen und SiLentFect als verwendetes Transfektionsreagenz zeigten keinen signifikanten Unterschied ($p<0,05$) im Wachstum zwischen den Zellen, die mit der icb-1-siRNA transfiziert wurden und denen, die mit der unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Dies kann daran liegen, dass die Expression des Gens nicht ausreichend gesenkt werden konnte. Der Knockdown lag bei den einzelnen Versuchsansätzen zwischen 7,9% und 52,9%. Meistens lag der Knockdown jedoch über 20% und entsprach demnach nicht der festgelegten Zielsetzung eines suffizienten Knockdowns von ≤ 20%. In Abbildung 3 wurde der mittlere Knockdown nach 72h, 96h und 120h nochmals graphisch dargestellt. Diese Kombination aus Zellzahl und Transfektionsreagenz wurde ebenfalls mit und ohne Stimulation durch E2 durchgeführt. Hier ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied im Wachstum der Zellen bei Behandlung mit und ohne E2.

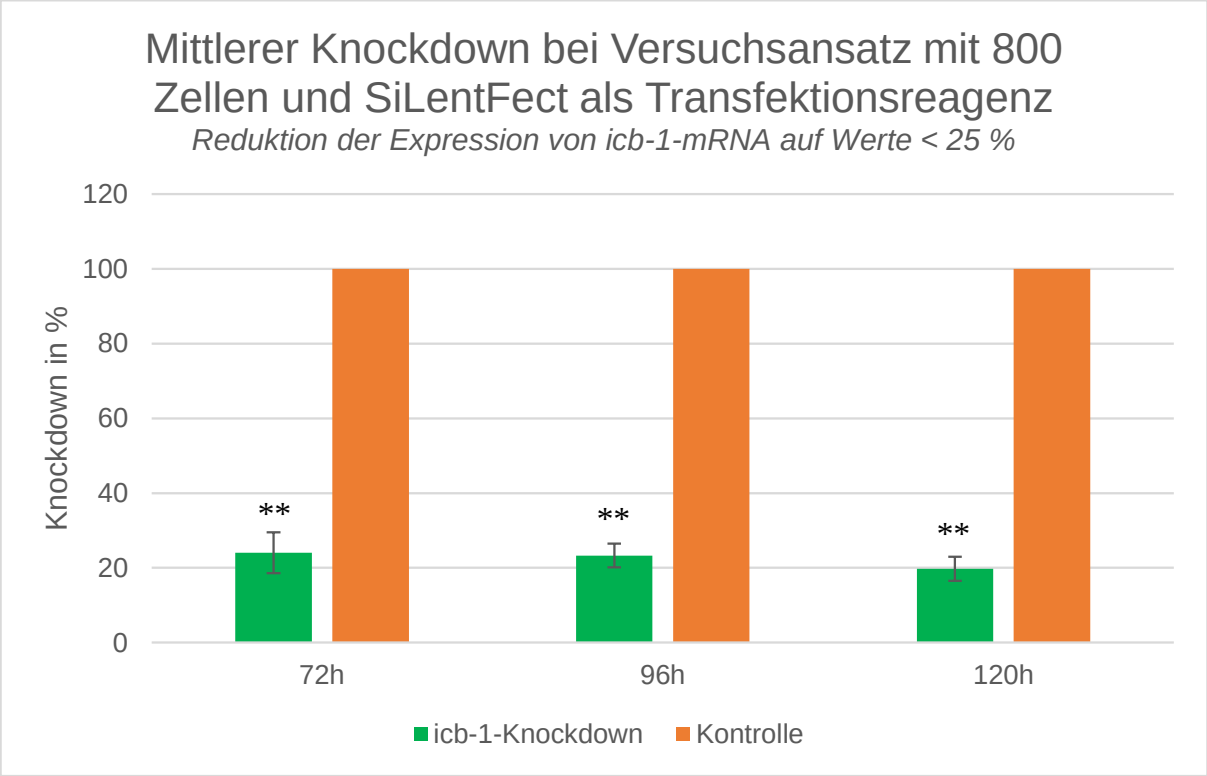


Abbildung 3: graphische Darstellung des icb-1-Knockdown nach 72h, 96h und 120h, Darstellung des Mittelwerts ± SEM, Angabe des Knockdowns in %, ein Sternchen (*) markiert ein signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren ein hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n=7

Schließlich wurde TransFectin als Transfektionsreagenz für die nachfolgenden CTB-Experimente festgelegt. Der im Ergebnisteil dargestellte Knockdown wurde immer mit TransFectin erzielt.

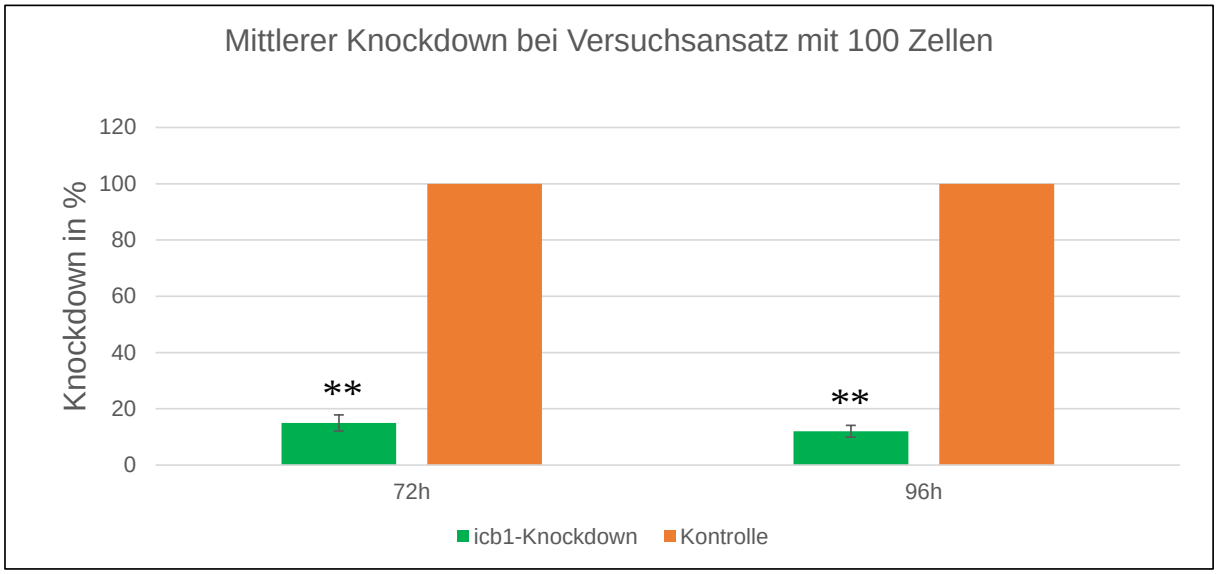
Des Weiteren wurde die Zellzahl für die Aussaat zu Beginn der CTB-Experimente variiert. Hierfür wurden Ansätze mit 100, 200 und 800 Zellen bei Aussaat gewählt. Hierbei wollte man die Zellzahl ermitteln, die am geeignetsten für das Wachstumsexperiment ist. Im Verlauf der Arbeit konnte nicht eindeutig ermittelt werden, welche Zellzahl sich am günstigsten auf das Experiment auswirkt. Deshalb wurden die verschiedenen Versuchsansätze mit den verschiedenen Zellzahlen beibehalten und bei den Ergebnissen auch entsprechend untergliedert.

4.2 Endgültige Ergebnisse mit dem optimierten Transfektionsprotokoll

Bei der Auswertung wurden die Ergebnisse zum einen untergliedert nach der Zellzahl, die bei Tag 0 für das CTB-Assay ausgesät wurde und zum anderen nach der zusätzlichen Stimulation der Zellen mit E2. Bei den Versuchsreihen mit Stimulation mit E2 wurden die icb-1-Knockdown-Zellen unter Stimulation mit E2 mit den Kontrollzellen, die ebenfalls mit E2 stimuliert wurden, verglichen. Bei den Ergebnissen zu den Versuchsreihen ohne Zugabe von E2 verhielt es sich genauso: es wurden die icb-1-Knockdown-Zellen, die ohne Stimulation mit E2 gewachsen sind mit den Kontrollzellen verglichen, welchen ebenfalls kein E2 zugegeben wurde.

Dann wurden letztlich noch die icb-1-Knockdown-Zellen mit und ohne Stimulation mit E2 untereinander verglichen. Dies wurde auch mit den Kontrollzellen durchgeführt, um den spezifischen Effekt der Zugabe von E2 auf die Proliferation der Zellen untersuchen zu können.

4.2.1 Mittlerer Knockdown der Versuchsansätze in der Übersicht



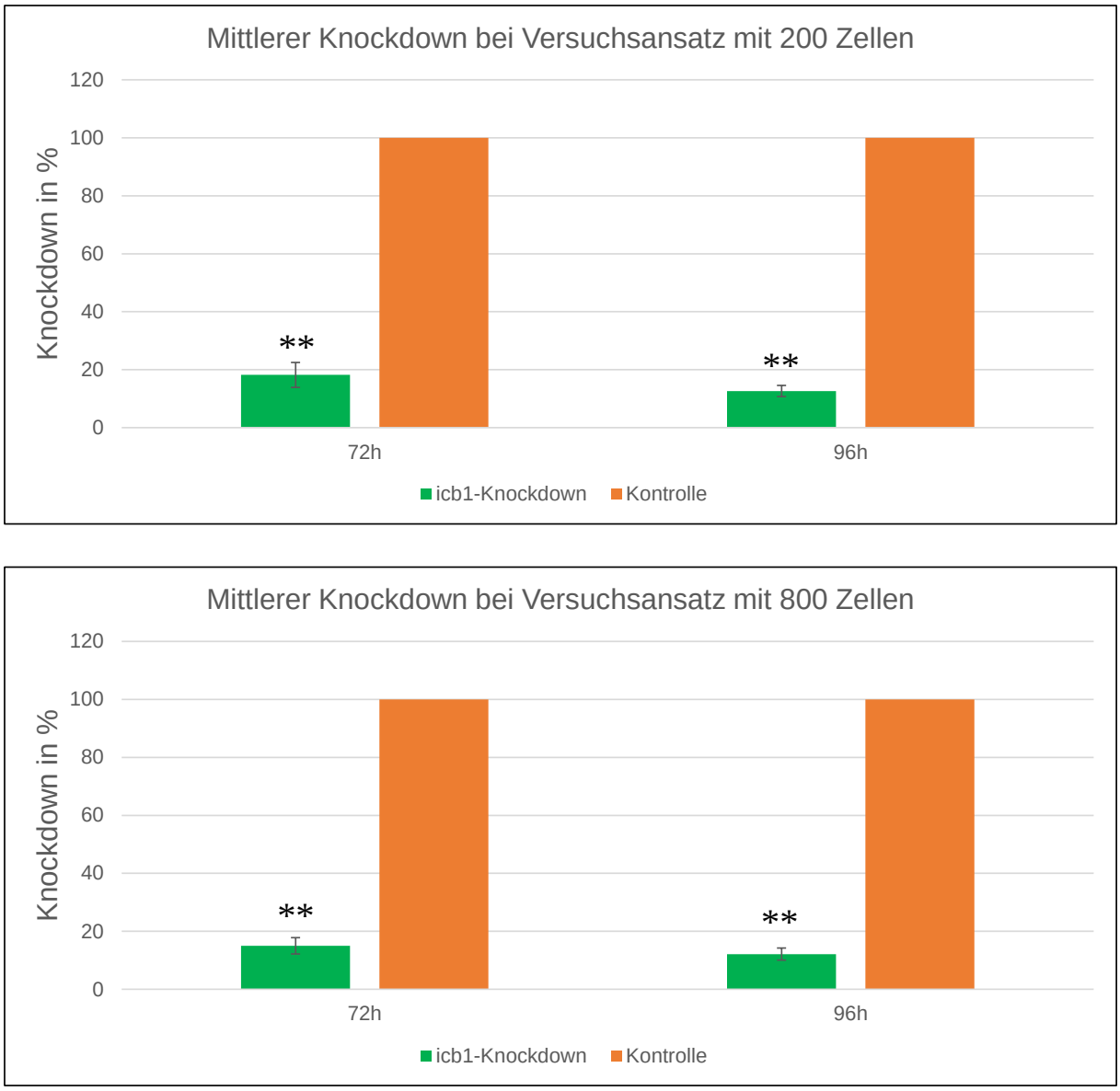


Abbildung 4: graphische Darstellung des icb-1-Knockdown nach 72h und 96h, Darstellung des Mittelwerts ± SEM, Angabe des Knockdowns in %, ein Sternchen (*) markiert ein signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren ein hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), getrennte Darstellung des mittleren Knockdowns der einzelnen Versuchsansätze mit den unterschiedlichen Zellzahlen 100, 200 und 800 bei Aussaat an Tag 0, n(100)=4, n(200)=5, n(800)=4

Der Versuchsaufbau mit 100 Zellen pro Well bei Aussaat an Tag 0 des Experiments und TransFectin als verwendetes Transfektionsreagenz wurde insgesamt viermal durchgeführt. Hieraus ergab sich ein Datensatz aus 24 Zellpopulationen, der mit ebenso vielen Kontroll-Zellpopulationen verglichen wurde. Der Knockdown betrug hierbei zwischen minimal 7,6% und maximal 20,6%. In Abbildung 4 (oberes

Diagramm) wurde der mittlere Knockdown nach 72h und 96h in Prozent im Bezug zur Kontrolle dargestellt. Der Mittelwert des Knockdowns nach 72h betrug 15% und nach 96h durchschnittlich 12%. Der transiente Knockdown war demnach als ausreichend für das Experiment anzunehmen.

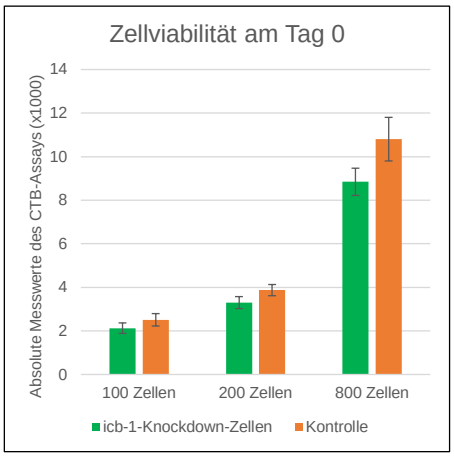
Der Versuchsaufbau mit 200 Zellen pro Well bei Aussaat an Tag 0 des Experiments und TransFectin als verwendetes Transfektionsreagenz wurde insgesamt fünfmal durchgeführt. Hieraus ergibt sich ein Datensatz aus 30 Zellpopulationen, der mit ebenso vielen Kontroll-Zellpopulationen verglichen wurde. Der Knockdown betrug hierbei zwischen minimal 7,6% und maximal 27,7%. Im mittleren Diagramm der Abbildung 4 wurde der mittlere Knockdown nach 72h und 96h in Prozent im Bezug zur Kontrolle dargestellt. Der Mittelwert des Knockdowns nach 72h betrug 18% und nach 96h durchschnittlich 13%. Der transiente Knockdown war demnach ebenso als ausreichend für das Experiment anzunehmen.

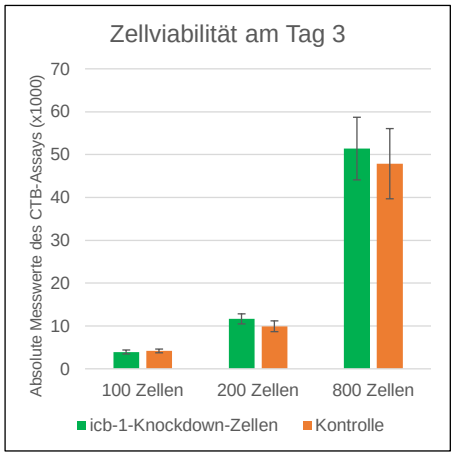
Der Versuchsaufbau mit 800 Zellen pro Well bei Aussaat an Tag 0 des Experiments und TransFectin als verwendetes Transfektionsreagenz wurde insgesamt viermal durchgeführt. Daraus ergibt sich schließlich ein Datensatz von 24 Zellpopulationen, der mit ebenso vielen Kontroll-Zellpopulationen verglichen wurde. Der Knockdown bewegte sich bei den vier Versuchsreihen zwischen minimal 7,6% und maximal 20,6%. Im unteren Diagramm der Abbildung 4 wurde der Mittelwert des Knockdown nach 72h und 96h in Prozent im Vergleich zur Kontrolle, welche auf 100% normiert wurde, dargestellt. Der mittlere Knockdown nach 72h betrug 15% und nach 96h durchschnittlich 12%. Der transiente Knockdown war für das Experiment demnach als ausreichend anzusehen.

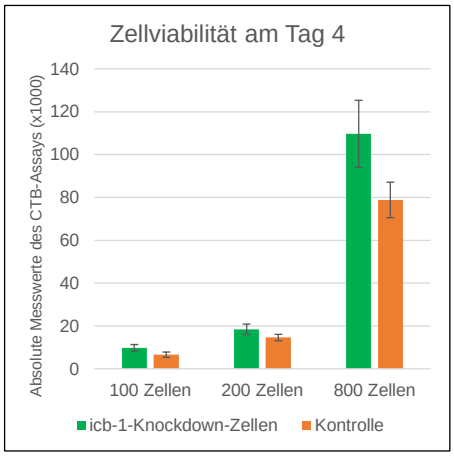
4.2.2 Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im zeitlichen Verlauf

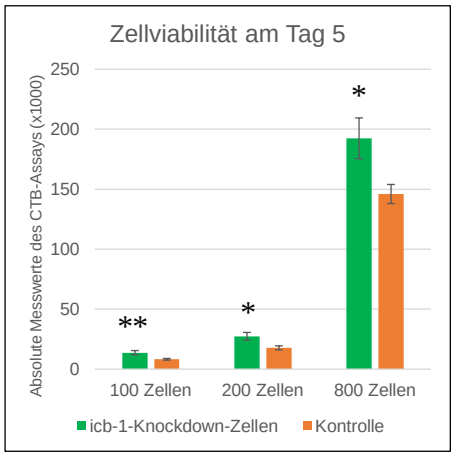
Im Folgenden wird die Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle im zeitlichen Verlauf von 7 Tagen dargestellt. Zuerst folgt eine Übersichtsdarstellung (Abbildung 5), welche die einzelnen Versuchsansätze mit

verschiedenen Zellzahlen an den einzelnen Tagen gemeinsam zeigt. Jedes Diagramm repräsentiert einen bestimmten Zeitpunkt nach Aussaat. Auf der y-Achse sind die absoluten Messwerte des CTB-Assays in tausender Schritten aufgetragen. Auf der x-Achse sind die gepaarten Versuchsansätze (icb-1-Knockdown-Zellen und Kontrolle) mit unterschiedlichen Zellzahlen aufgetragen. Die grünen Balken stellen dabei jeweils die icb-1-Knockdown-Zellen dar. Die orangen Balken stellen hingegen die Kontrolle dar. Zudem wurde zu jedem Datensatz der standard error oft the mean errechnet und als Fehlerbalken im Diagramm eingefügt. Man kann bereits an Tag 3 optisch ein höheres Zellwachstum der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle bei den Versuchsansätzen mit 200 und 800 Zellen bei Aussaat erkennen. Dieser Unterschied ist bei allen drei Versuchsansätzen an Tag 5 signifikant. Beim Versuchsansatz mit Aussaat von 100 Zellen an Tag 0 zeigt sich sogar ein hoch signifikanter Unterschied ($p<0,01$) im Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle an Tag 5.









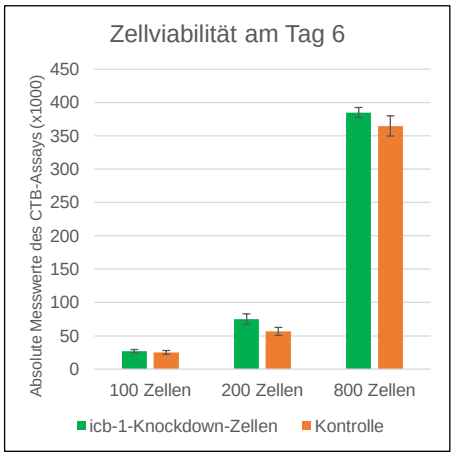


Abbildung 5: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle an den einzelnen Tagen nach Aussaat, Darstellung der unterschiedlichen Versuchsansätze mit unterschiedlichen Zellzahlen gemeinsam in einem Diagramm zu

einem bestimmten Zeitpunkt, Inklusion aller Daten, Darstellung des Mittelwerts ± SEM, Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n(100)=4, n(200)=5, n(800)=4

Im Folgenden werden die Versuchsansätze mit Aussaat von 100, 200 beziehungsweise 800 Zellen an Tag 0 nochmals separat dargestellt.

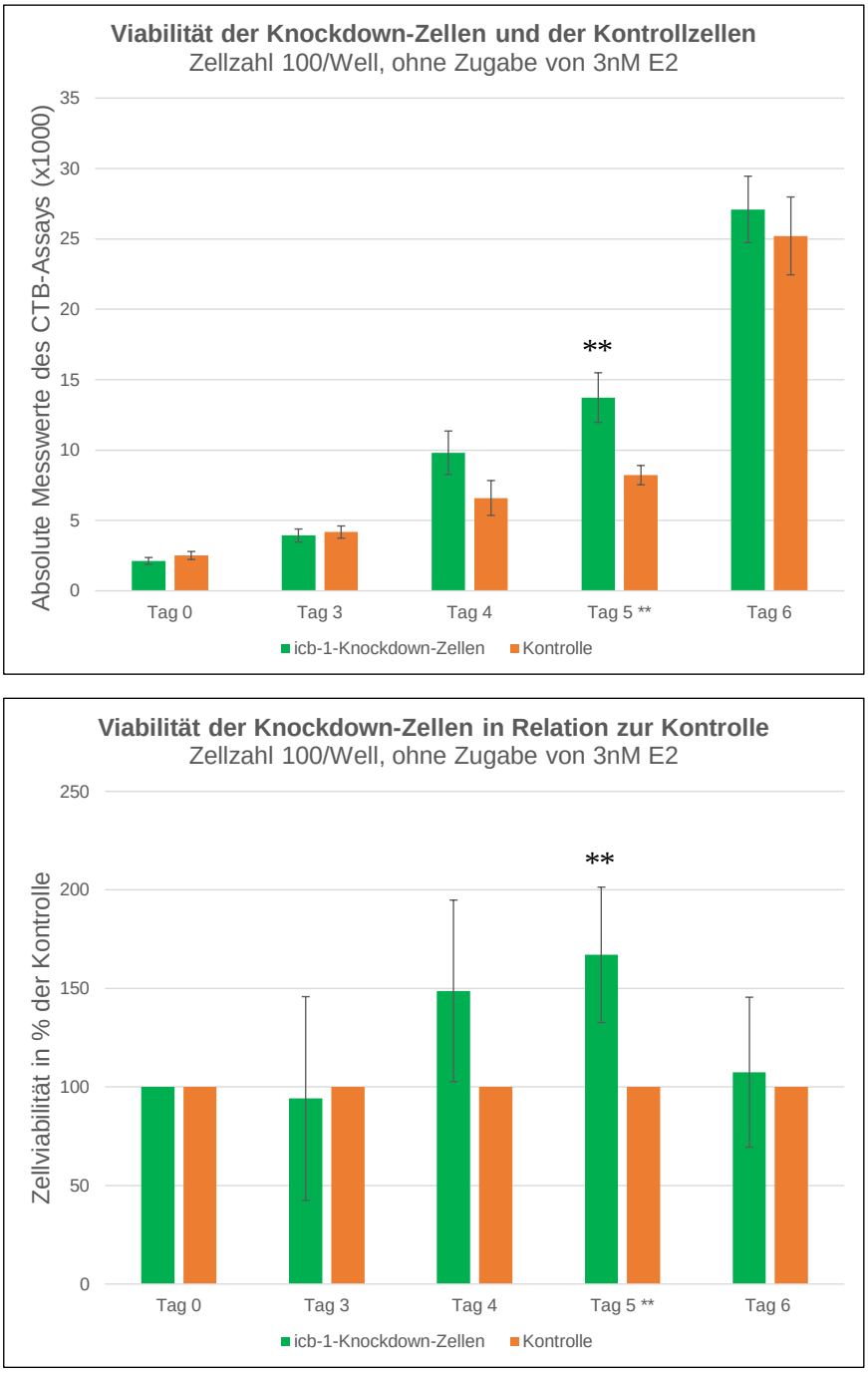


Abbildung 6: oben: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle über 7 Tage, unten: Darstellung der Zellproliferation in % in Relation zur Kontrolle über 7 Tage, Aussaat von 100 Zellen pro Well an Tag 0, ein

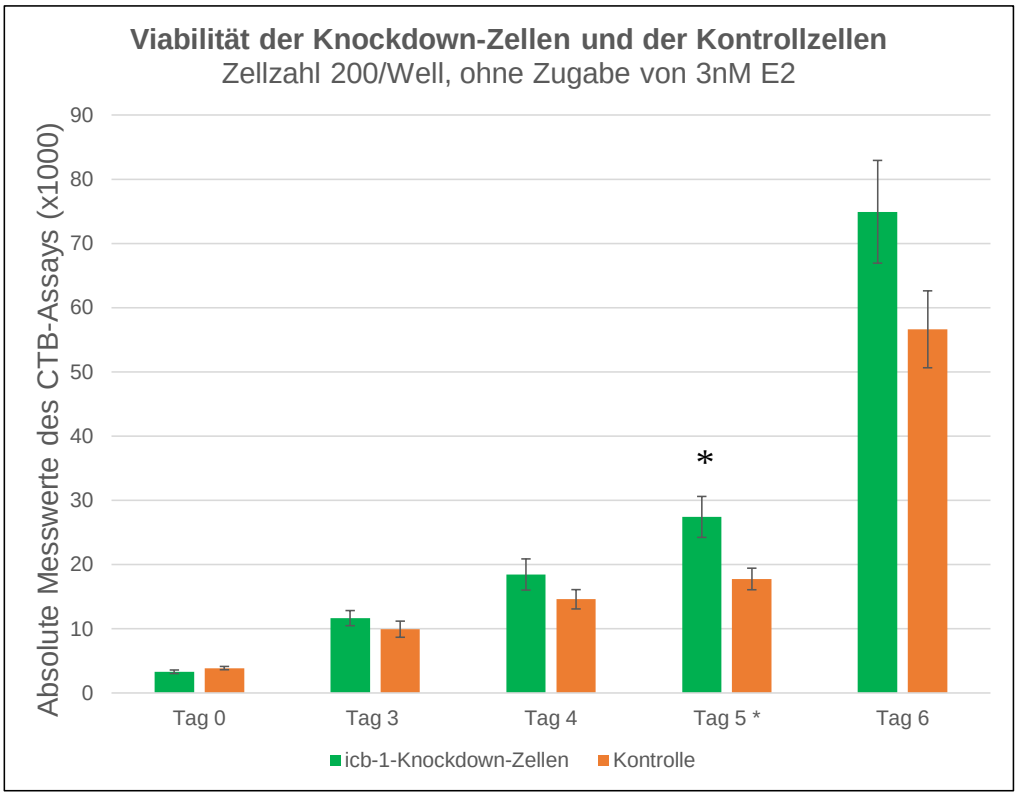
Sternchen (*) markiert ein signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren ein hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n=4

Im oberen Diagramm der Abbildung 6 ist die Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle über ein Zeitintervall von insgesamt sieben Tagen dargestellt (Tag 0 bis Tag 6). Die grünen Balken stellen den Mittelwert der viablen icb-1-Knockdown-Zellen des jeweiligen Tages dar. Die orangen Balken hingegen stellen den Mittelwert der viablen Zellen der Kontrolle am jeweiligen Tag dar. Auf der y-Achse sind die absoluten Messwerte des CTB-Assays in tausender Schritten skaliert. Auf der x-Achse sind die Tage nach Aussaat aufgetragen. Der Tag der Aussaat der Zellen wurde mit Tag 0 bezeichnet. Außerdem wurde zu jedem Datensatz (Darstellung als grüne beziehungsweise orange Balken) der standard error oft the mean errechnet und als Fehlerbalken im Diagramm eingefügt. Beim Versuchsansatz mit Aussaat von 100 Zellen an Tag 0 (Abbildung 6) zeigt sich graphisch ein höheres Wachstum der icb-1-siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zu den Zellen, die mit der negativen Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Dies kann man bereits am Tag 4 optisch erkennen. An Tag 5 zeigt sich dann auch ein hoch signifikanter Unterschied (p<0,01) zwischen den beiden Zellpopulationen, welcher in der Graphik mit zwei Sternchen gekennzeichnet wurde. Im unteren Diagramm der Abbildung 6 wurde nun die Kontrolle am jeweiligen Tag auf 100% normiert und dann in Relation dazu das Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen errechnet. Auch hier repräsentieren die grünen Balken die icb-1-Knockdown-Zellen und die orangen Balken die Kontrolle. Auf der y-Achse ist die Zellviabilität in Prozent in Relation zur Kontrolle aufgetragen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Messzeitpunkte aufgetragen. Ebenso wurde für die icb-1-Knockdown-Zellen der standard error of the mean errechnet und im Diagramm als Fehlerbalken eingetragen. An Tag 5 ergibt sich hier beispielsweise ein um 67% höheres Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

In Tabelle 3 sind die p-Werte der Versuche mit 100 Zellen bei Aussaat an Tag 0 aufgelistet. An Tag 5 zeigt sich ein p-Wert von 0,004, was als hochsignifikanter Unterschied gewertet wird.

	Tag 0	**Tag 3**	**Tag 4**	**Tag 5**	**Tag 6**
p-Werte	0,316	0,702	0,108	*0,004*	0,607

Tabelle 3: Aussaat von 100 Zellen pro Well, ohne Zusatz von E2, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben, n=4



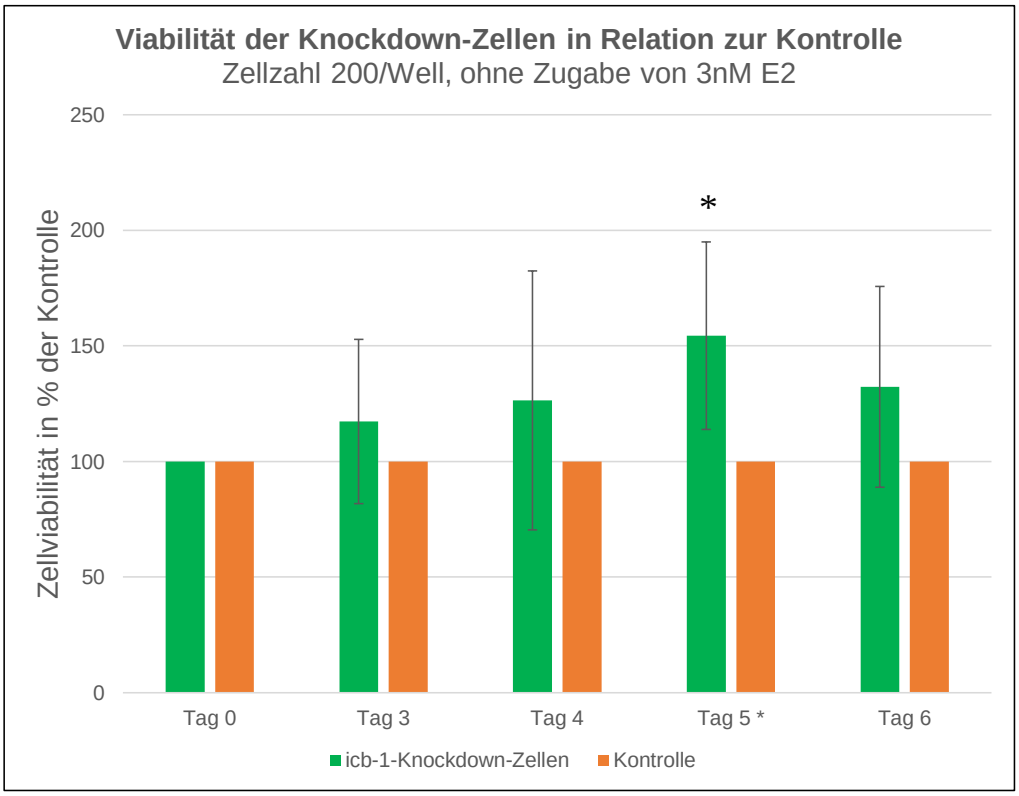


Abbildung 7: oben: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle über 7 Tage, unten: Darstellung der Zellproliferation in % in Relation zur Kontrolle über 7 Tage, Aussaat von 200 Zellen pro Well, ein Sternchen (*)

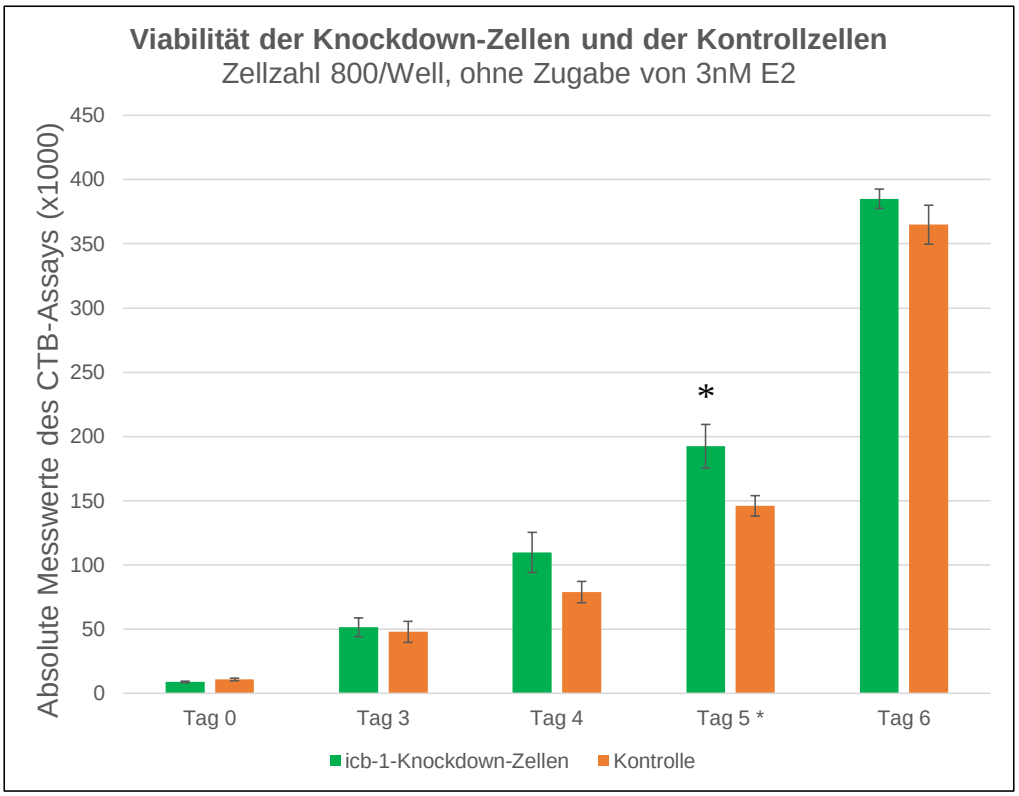
markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n=5

In Abbildung 7 wird nun der Verlauf des Wachstums der icb-1-Knockdown-Zellen beim Versuchsansatz mit Aussaat von 200 Zellen an Tag 0 dargestellt. Wie bereits oben erläutert wird auch in Abbildung 7 im oberen Diagramm das Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen (grüne Balken) im zeitlichen Verlauf von insgesamt 7 Tagen (Tag 0 bis Tag 6) im Vergleich zur Kontrolle (orange Balken) dargestellt. Auf der y-Achse sind wieder die absoluten Messwerte des CTB-Assays in tausender Schritten aufgetragen. Auf der x-Achse sind die Messzeitpunkte nach Aussaat aufgetragen. Der Tag der Aussaat der Zellen wurde mit Tag 0 bezeichnet. Der standard error of the mean ist als Fehlerbalken über den jeweiligen Balken im Diagramm eingefügt. Ab Tag 3 zeigt sich bereits optisch das höhere Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen (grüne Balken) im Vergleich zur Kontrolle (orange Balken). An Tag 5 zeigt sich dann ein signifikant (p<0,05) höheres Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen. Dieses wurde im Diagramm mit einem Sternchen verdeutlicht. Im unteren Diagramm der Abbildung 7 wird wiederum das Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen in Prozent zur Kontrolle dargestellt. Der Mittelwert der Kontrolle am jeweiligen Tag wurde auf 100% normiert. Dann wurde das Wachstum der icb-1-Knockdown in Prozent in Relation dazu errechnet. Auch hier repräsentieren die grünen Balken die icb-1-Knockdown-Zellen und die orangen Balken die Kontrolle. Auf der y-Achse ist die Zellviabilität in Prozent in Relation zur Kontrolle aufgetragen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Messzeitpunkte in Tagen aufgetragen. Ebenso wurde für die icb-1-Knockdown-Zellen der standard error of the mean errechnet und im Diagramm als Fehlerbalken eingetragen. An Tag 5, an dem ein signifikanter Unterschied im Wachstum der Zellen besteht, ergibt sich hierbei ein um 54% höheres Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

In Tabelle 4 sind nochmals die p-Werte der t-Tests der einzelnen Tage dargestellt. An Tag 5 ergab sich ein p-Wert von 0,01, was als signifikantes Ergebnis gewertet wird.

	Tag 0	**Tag 3**	**Tag 4**	**Tag 5**	**Tag 6**
p-Werte	0,135	0,325	0,182	*0,010*	0,074

Tabelle 4: Aussaat von 200 Zellen pro Well, ohne Zusatz von E2, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben, n=5



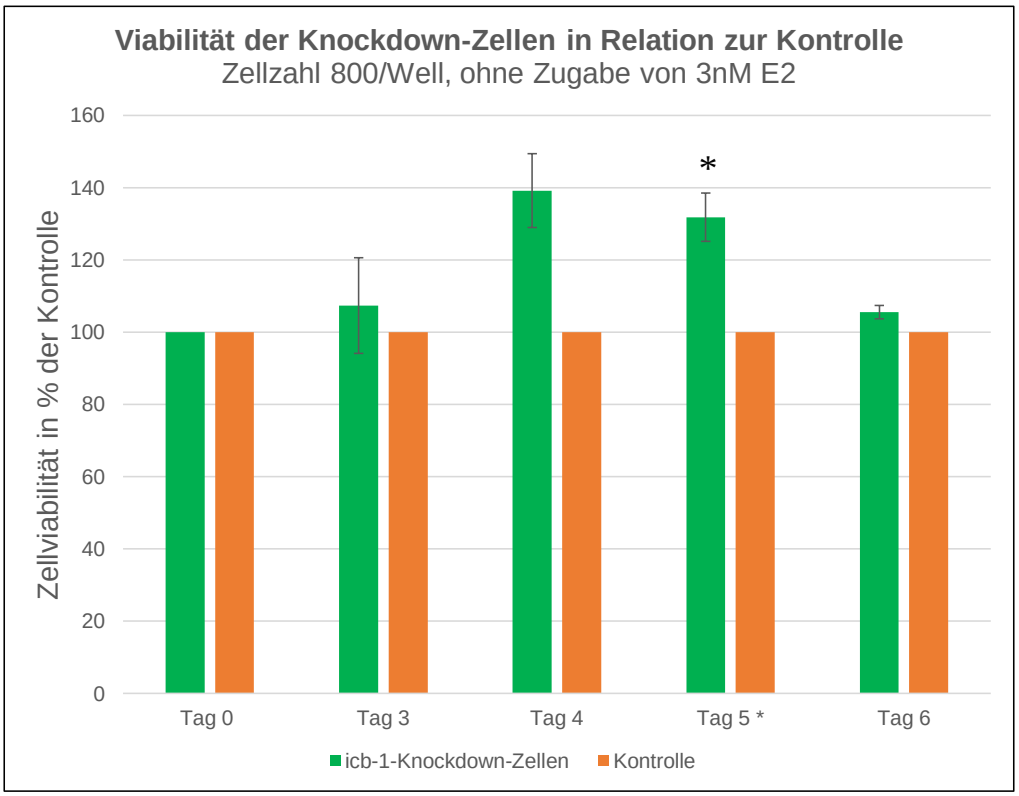


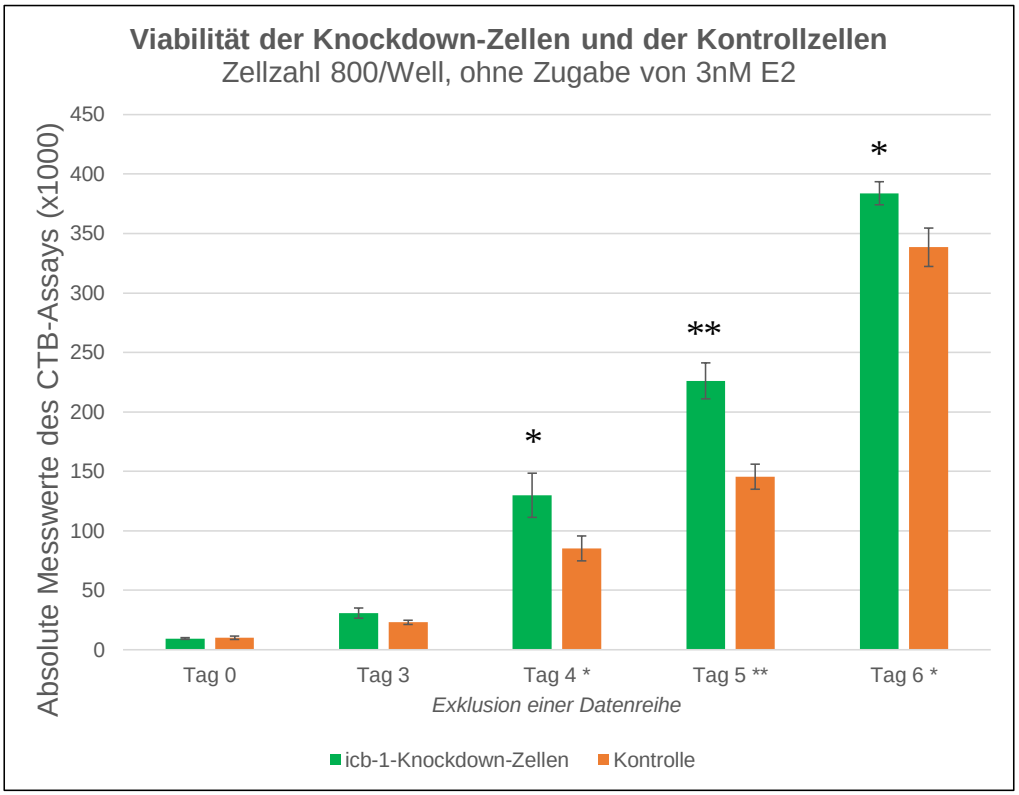
Abbildung 8: oben: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle über 7 Tage, unten: Darstellung der Zellproliferation in % in Relation zur Kontrolle über 7 Tage, Aussaat von 800 Zellen pro Well, ein Sternchen (*)

markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n=4

In Abbildung 8 wird nun der Verlauf des Zellwachstums bei Aussaat von 800 Zellen an Tag 0 dargestellt. Auch hier wird wieder im oberen Diagramm der Abbildung 8 der Mittelwert der absoluten Messwerte des CTB-Assays der icb-1-Knockdown-Zellen und der Kontrolle an den Tagen 0, 3, 4, 5 und 6 dargestellt. Die grünen Balken stellen dabei die icb-1-Knockdown-Zellen und die orangen Balken die Kontrolle dar. Auch hier kann man bereits ab Tag 3 optisch erkennen, dass die icb-1-Knockdown-Zellen schneller wachsen als die Kontrolle. Am Tag 5 ergibt sich hier ein signifikant höheres Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen (p<0,05) im Vergleich zur Kontrolle. Dies ist im oberen Diagramm in Abbildung 8 mit einem Sternchen gekennzeichnet. Im unteren Diagramm der Abbildung 8 wird wieder der Unterschied im Wachstum der Vergleichsgruppen in Prozent dargestellt. Hierbei ist wiederum die Kontrolle auf 100% am jeweiligen Tag normiert und das Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen dazu in Relation gesetzt. An Tag 5 ergibt sich ein um 32% höheres Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. In Tabelle 5 sind schließlich die Ergebnisse der t-Tests an den einzelnen Tagen aufgelistet. An Tag 5 ergab sich ein p-Wert von 0,02, was als signifikanter Unterschied gewertet wird.

	Tag 0	**Tag 3**	**Tag 4**	**Tag 5**	**Tag 6**
p-Werte	0,10	0,75	0,08	*0,02*	0,23

Tabelle 5: Aussaat von 800 Zellen pro Well, ohne Zusatz von E2, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben, n=4



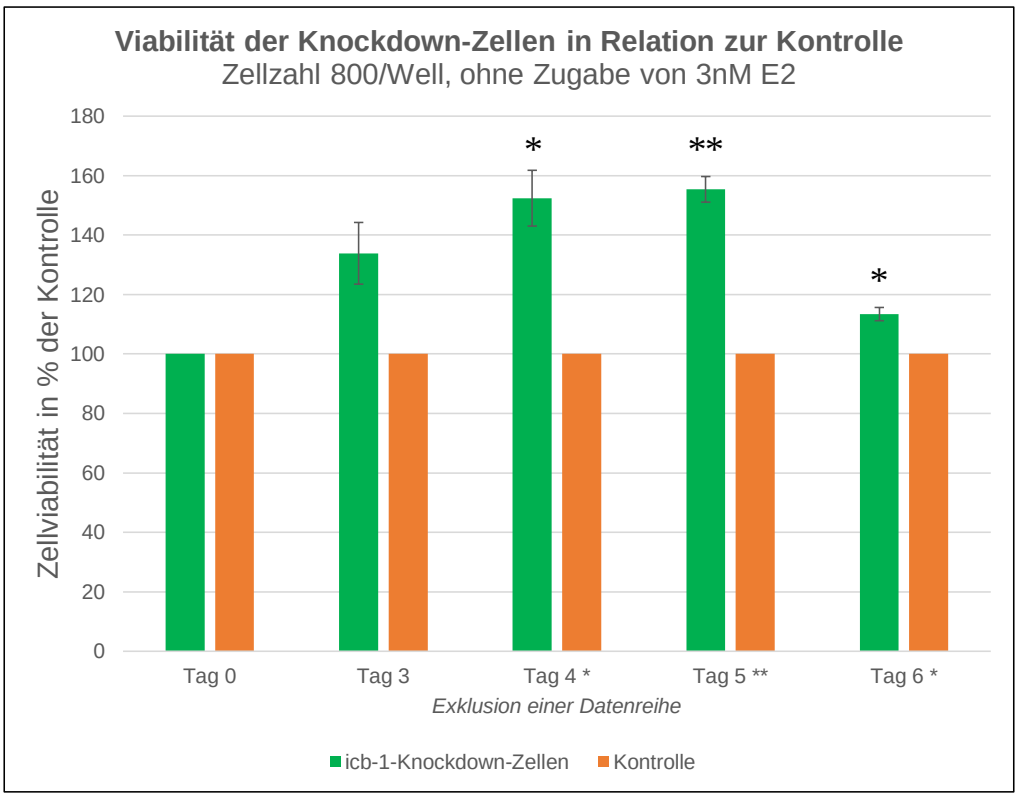


Abbildung 9: oben: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle über 7 Tage, unten: Darstellung der Zellproliferation in % in Relation zur Kontrolle über 7 Tage, Aussaat von 800 Zellen pro Well, Exklusion einer Datenreihe mit icb-1-Knockdown ≥ 20%, ein Sternchen (*) markiert signifikantes

Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n=3

In Abbildung 9 wird der Versuchsansatz mit 800 Zellen bei Aussaat an Tag 0 nochmals nach Exklusion einer Datenreihe dargestellt. Es wurde die Datenreihe ausgeschlossen bei der man ein Knockdown von icb-1 von mehr als 20% erzielte. Die Abbildung 9 ist wiederum auf dieselbe Weise aufgebaut wie die vorhergehenden Diagramme: Die grünen Balken stellen die icb-1-Knockdown-Zellen und die orangen Balken die Kontrolle dar. Auf der y-Achse sind die absoluten Werte des CTB-Assays und auf der x-Achse die Messzeitpunkte über 7 Tage aufgetragen. Zudem ist als Fehlerbalken jeweils der standard error of the mean eingefügt. Nun zeigt sich nach Exklusion der Datenreihe an Tag 4, 5 und 6 ein signfikant höheres Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Bei Tag 5 wurde dabei ein hoch signfikanter Unterschied (p<0,01) errechnet. Im unteren Diagramm der Abbildung 9 ist dann wieder der Unterschied im Wachstum zwischen den icb-1-Knockdown-Zellen und der Kontrolle in Prozent dargestellt. Die Kontrolle ist auf 100% am jeweiligen Tag normiert und dazu das Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen in Relation gesetzt. An Tag 5 ergibt sich ein um 55% höheres Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. In Tabelle 6 sind die errechneten p-Werte nach Exklusion der Datenreihe aufgelistet.

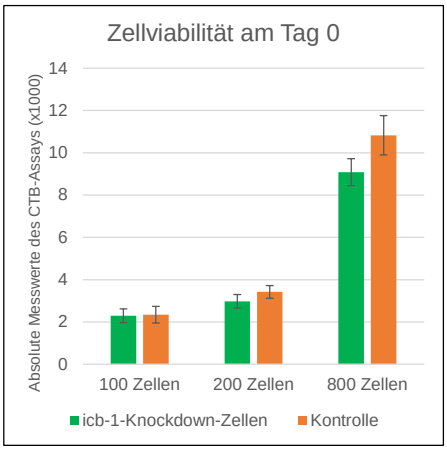
	Tag 0	**Tag 3**	**Tag 4**	**Tag 5**	**Tag 6**
p-Werte	0,7096	0,1184	*0,0411*	*0,0001*	*0,0201*

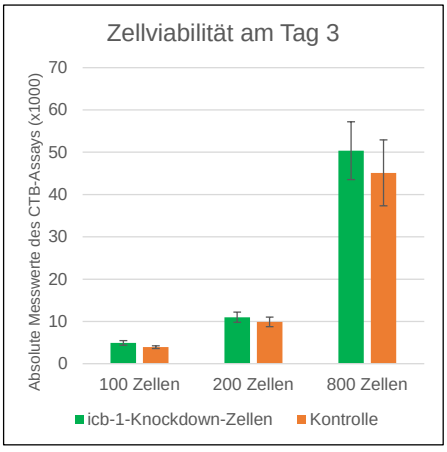
Tabelle 6: Aussaat von 800 Zellen pro Well, ohne Zusatz von E2, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben, Exklusion einer Datenreihe mit icb-1-Knockdown ≥ 20%, n=3

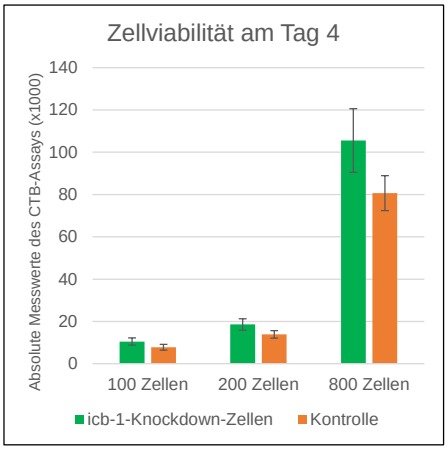
4.2.3 Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen mit Stimulation mit E2

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche mit zusätzlicher Zugabe einer E2-Mischung dargestellt. Die E2-Mischung wurde in gleicher Konzentration (3nM) zu den icb-1-Knockdown-Zellen sowie zur Kontrolle an Tag 0 gegeben. Abbildung 10 dient zunächst der Übersicht. Hier sind die verschiedenen Ansätze mit Aussaat variierender Zellzahlen an Tag 0 gemeinsam dargestellt. Jedes Diagramm stellt einen Tag der

Versuchsreihe dar. Nebeneinander sind dann die einzelnen Versuchsansätze mit den Zellzahlen 100, 200 und 800 dargestellt. Auf der y-Achse sind die absoluten Messwerte des CTB-Assays in tausender Schritten aufgetragen. Auf der x-Achse sind die gepaarten Versuchsansätze (icb-1-Knockdown-Zellen und Kontrolle) mit unterschiedlichen Zellzahlen aufgetragen. Die grünen Balken stellen die icb-1-Knockdown-Zellen dar. Die orangen Balken stellen hingegen die Kontrolle dar. Zudem wurde zu jedem Datensatz der standard error oft the mean errechnet und als Fehlerbalken im Diagramm eingefügt. Bereits ab Tag 3 nach Aussaat zeigt sich in der Graphik optisch das höhere Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen bei allen drei Versuchsansätzen. An Tag 5 lässt sich ein signifikanter Unterschied ($p<0,05$) im Wachstum der Zellen bei der Versuchsreihe mit Aussaat von 200 Zellen an Tag 0 feststellen. Dieser Unterschied wurde in der Graphik mit einem Sternchen gekennzeichnet. An Tag 6 zeigt sich ein hoch signifikant höheres Wachstum ($p<0,01$) der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle beim Versuchsansatz mit 100 Zellen bei Aussaat an Tag 0. Dieser Unterschied wurde im entsprechenden Diagramm mit zwei Sternchen gekennzeichnet.







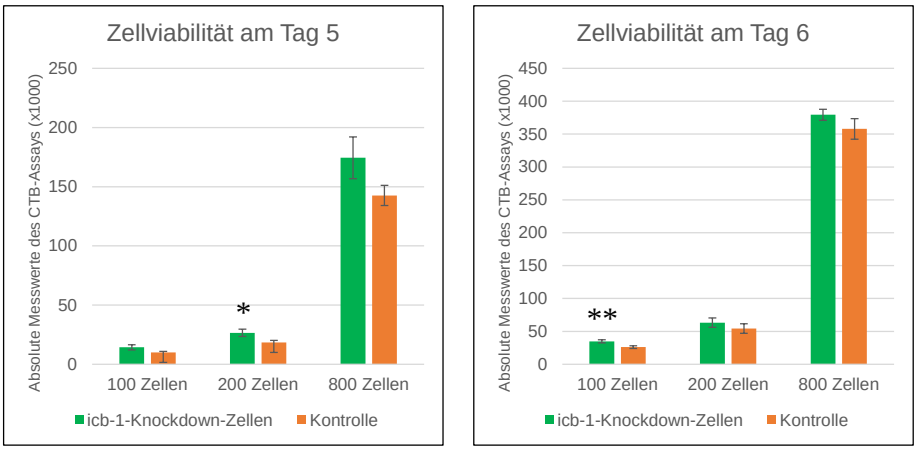
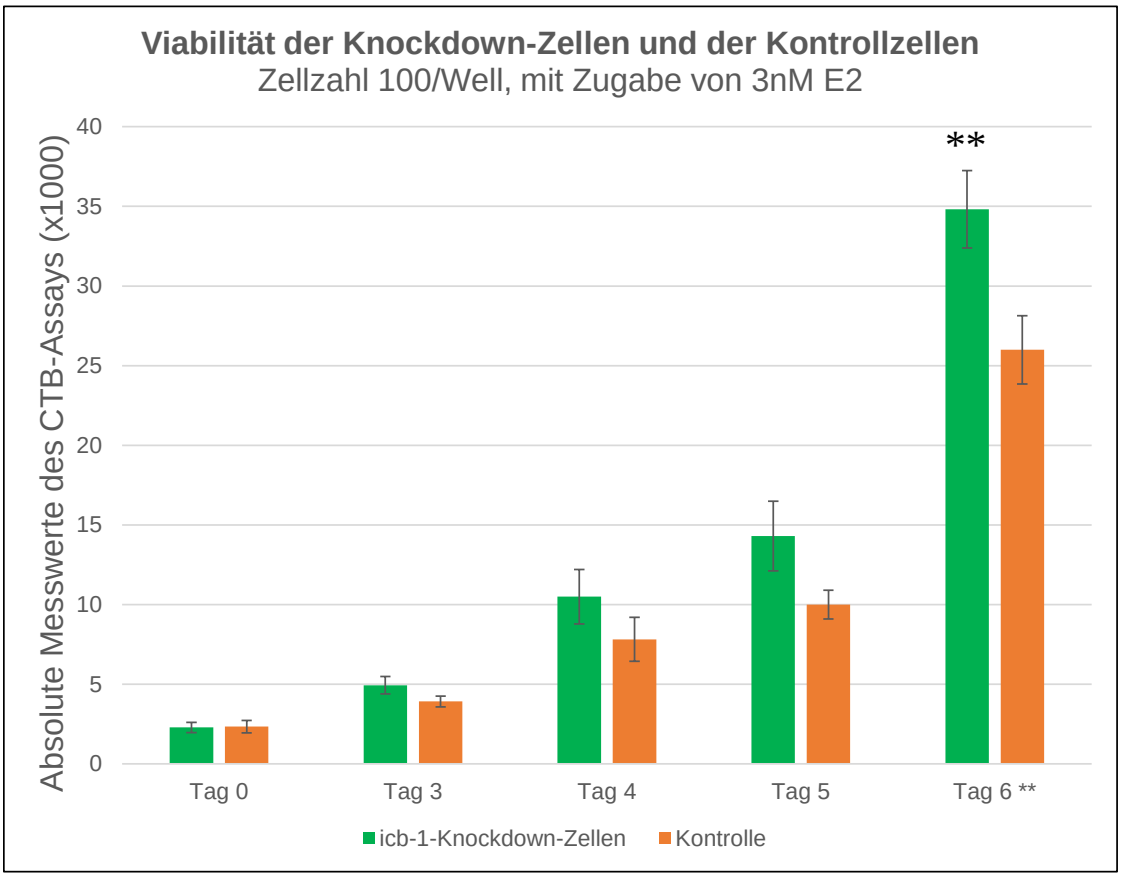


Abbildung 10: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle an den einzelnen Tagen, Darstellung der unterschiedlichen Versuchsansätze mit unterschiedlichen Zellzahlen an Tag 0, mit Zugabe von E2, Inklusion aller Daten, Darstellung des Mittelwerts ± SEM, Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n(100)=4, n(200)=5, n(800)=4

Im Folgenden werden die einzelnen Versuchsansätze mit den unterschiedlichen Zellzahlen 100, 200 und 800 nochmals getrennt dargestellt.



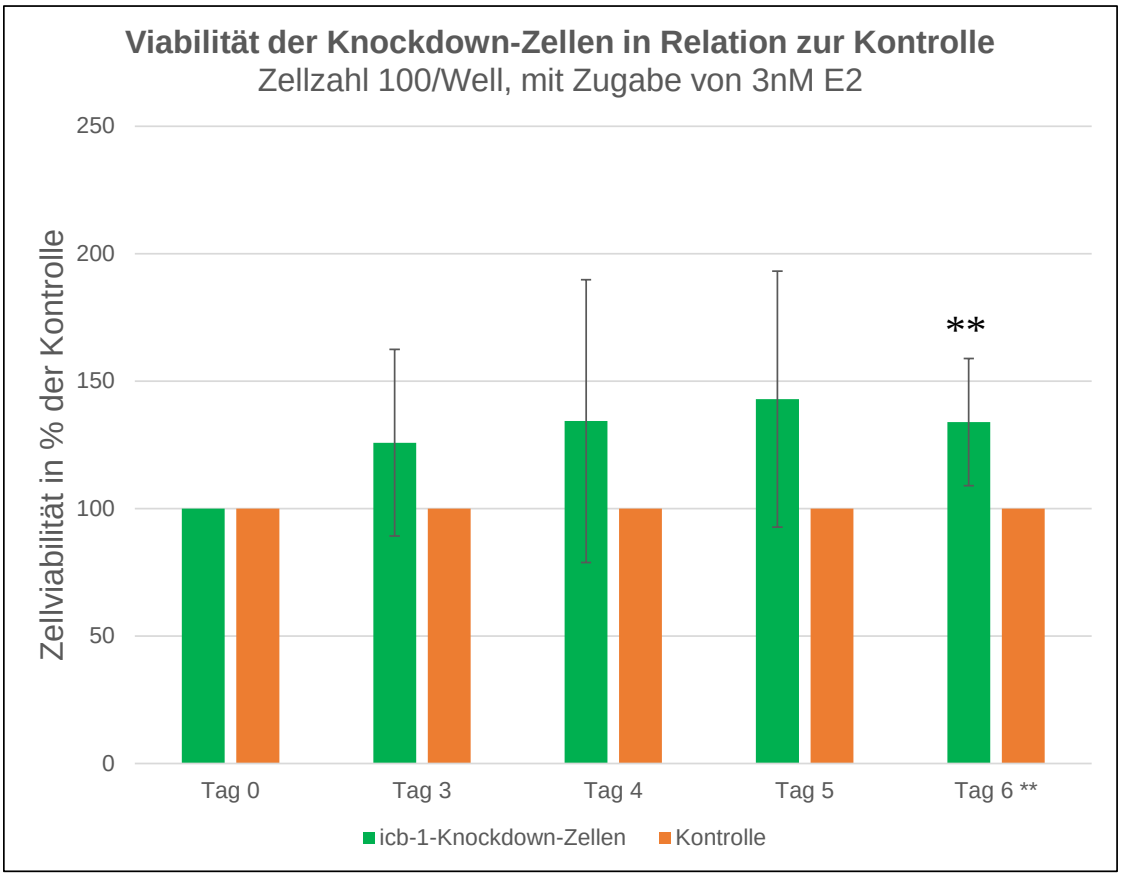


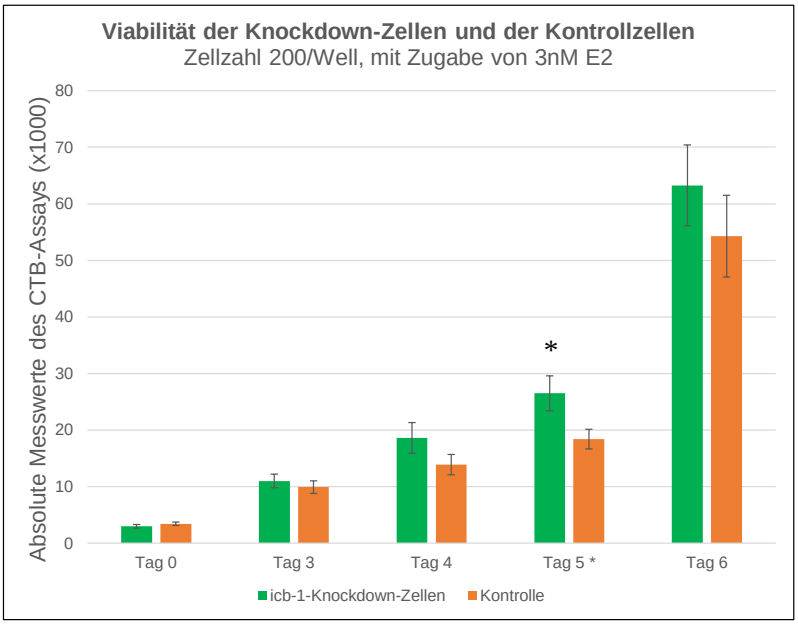
Abbildung 11: oben: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle über 7 Tage, unten: Darstellung der Zellproliferation in % in Relation zur Kontrolle über 7 Tage, Aussaat von 100 Zellen pro Well, mit Zusatz von E2, ein Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n=4

Das obere Diagramm in Abbildung 11 zeigt die Mittelwerte der viablen Zellen der icb-1-Knockdown-Zellen und der Kontrollzellen im zeitlichen Verlauf von sieben Tagen. Die grünen Balken repräsentieren die icb-1-Knockdown-Zellen und die orangen Balken repräsentieren die Kontrollzellen. Bereits ab Tag 3 zeigt sich optisch ein höheres Wachstum der grünen Balken. An Tag 6 ist dieser Unterschied dann schließlich hoch signifikant mit einem p-Wert von 0,009. Das untere Diagramm der Abbildung 11 zeigt nun das relative Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen in Prozent zur Kontrolle. Die Kontrolle wurde an den einzelnen Tagen auf 100% normiert und hieraus das Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen in Prozent errechnet. An Tag 6 zeigt sich ein um 34% höheres Wachstum im Vergleich zur Kontrolle. Im Anschluss zeigt Tabelle 7

die p-Werte der t-Tests der einzelnen Tage. Der p-Wert an Tag 6 beträgt 0,009, was als hoch signifikantes Ergebnis gewertet wird.

	Tag 0	**Tag 3**	**Tag 4**	**Tag 5**	**Tag 6**
p-Werte	0,928	0,127	0,226	0,076	*0,009*

Tabelle 7: Aussaat von 100 Zellen pro Well, mit Zusatz von E2, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben, n=4



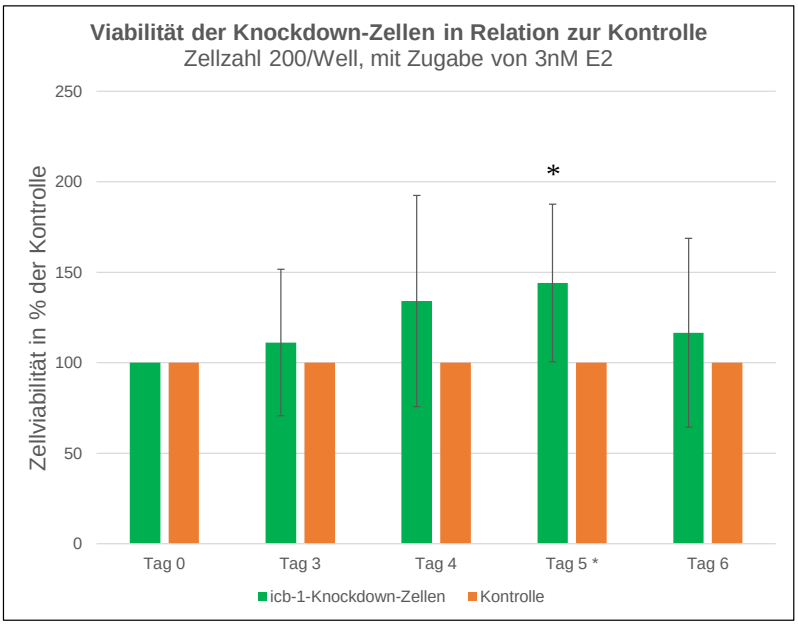


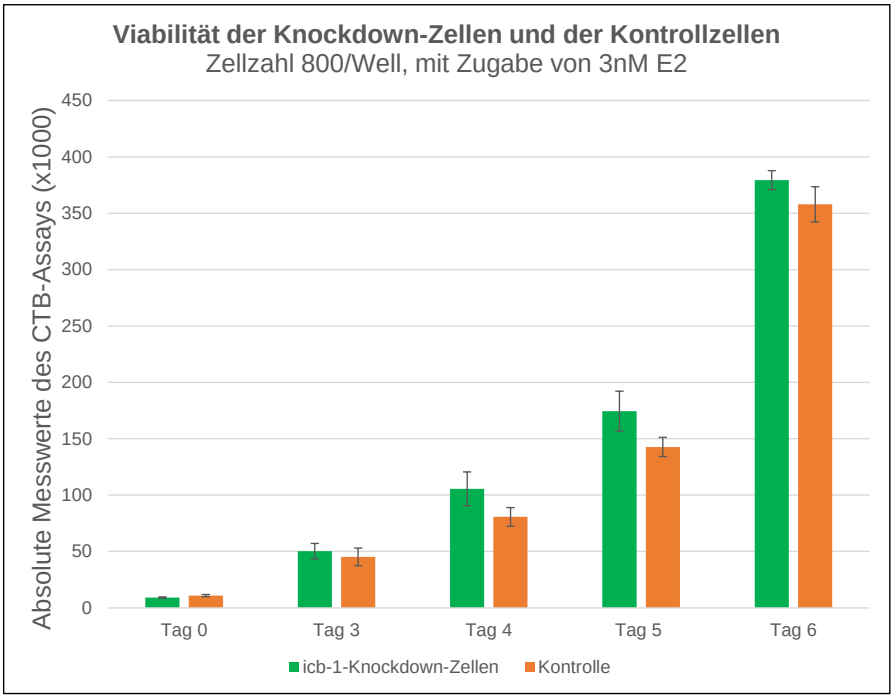
Abbildung 12: oben: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle über 7 Tage, unten: Darstellung der Zellproliferation in % in

Relation zur Kontrolle über 7 Tage, Aussaat von 200 Zellen pro Well, mit Zusatz von E2, ein Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n=5

Die Ergebnisse des Versuchsaufbaus mit 200 Zellen bei Aussaat an Tag 0 sind wieder auf dieselbe Weise aufgebaut. Im oberen Diagramm der Abbildung 12 wurden die Mittelwerte der absoluten Messwerte des CTB-Assays der icb-1-Knockdown-Zellen (grüne Balken) und der Kontrollzellen (orange Balken) der einzelnen Tage dargestellt. Ebenfalls wurde der standard error of the mean als Fehlerbalken eingefügt. An Tag 5 zeigt sich ein signifikant höheres Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Der p-Wert beträgt 0,027. Dies wurde im Diagramm mit einem Sternchen gekennzeichnet. Im unteren Diagramm der Abbildung 12 wurde wiederrum das prozentuale Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen in Relation zur Kontrolle gezeigt. An Tag 5 zeigt sich ein um 44% höheres Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Schließlich zeigt Tabelle 8 nochmals die einzelnen Ergebnisse des t-Tests der einzelnen Tage.

	Tag 0	**Tag 3**	**Tag 4**	**Tag 5**	**Tag 6**
p-Werte	0,313	0,504	0,151	*0,027*	0,380

Tabelle 8: Aussaat von 200 Zellen pro Well, mit Zusatz von E2, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben, n=5



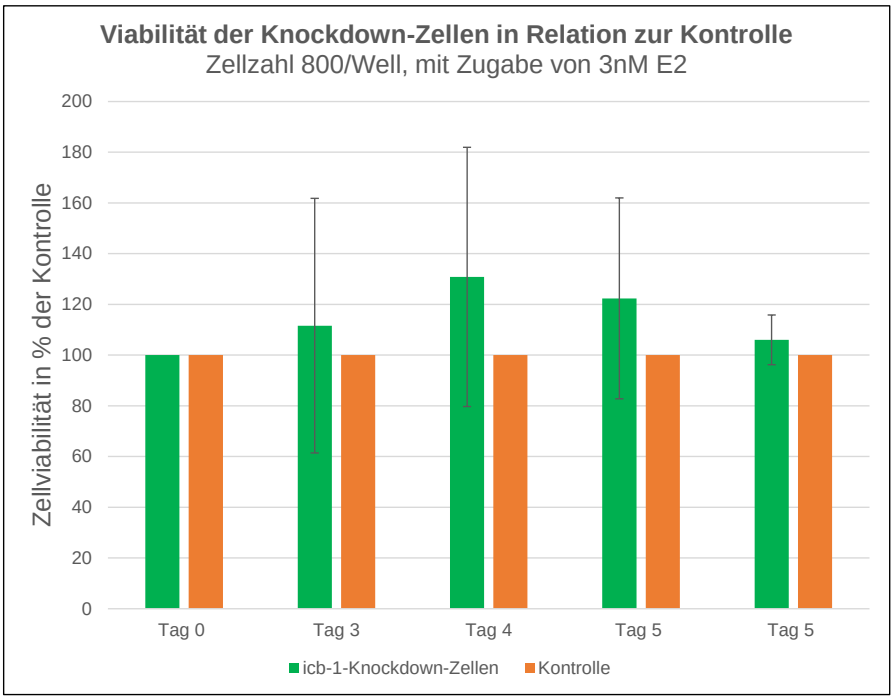
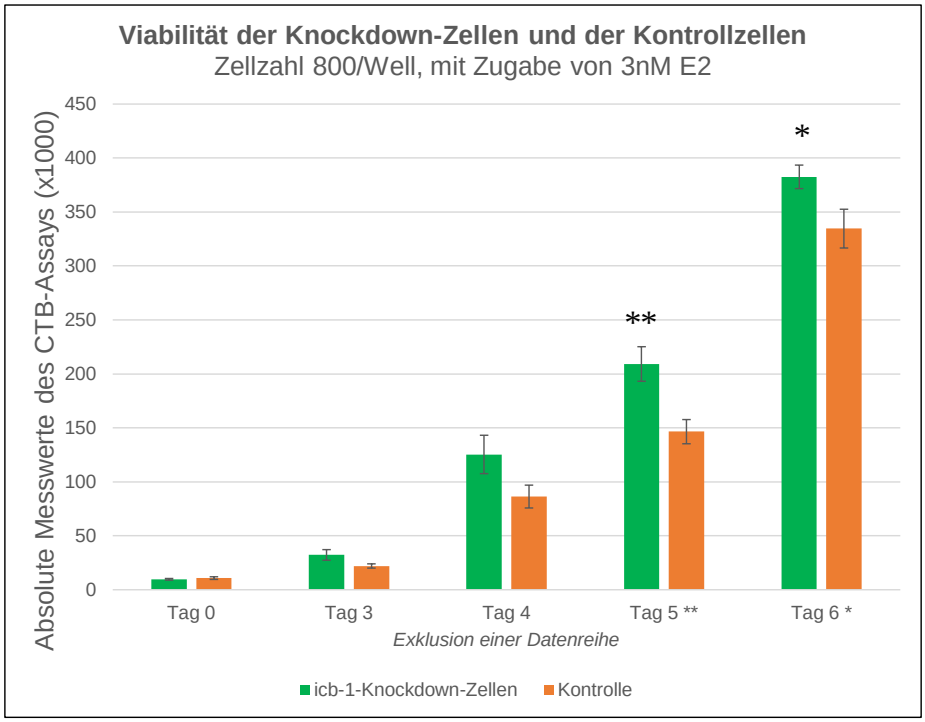


Abbildung 13: oben: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle über 7 Tage, unten: Darstellung der Zellproliferation in % in Relation zur Kontrolle über 7 Tage, Aussaat von 800 Zellen pro Well, mit Zusatz von E2, ein Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n=4

Zuletzt wird der Versuchsaufbau mit Aussaat von 800 Zellen pro Well an Tag 0 dargestellt. Abbildung 13 zeigt nun wieder im oberen Diagramm die absoluten Messwerte des CTB-Assays der icb-1-Knockdown-Zellen (grüne Balken) und der Kontrolle (orange Balken) an den Tagen 0, 3, 4, 5 und 6. Optisch zeigt sich ab Tag 3 ein höheres Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Jedoch zeigt sich in dieser Versuchsreihe kein signifikantes Ergebnis im t-Test. Im unteren Diagramm der Abbildung 13 wird schließlich das prozentuale Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen in Relation zur Kontrolle dargestellt. An Tag 3 errechnet sich ein um 12%, an Tag 4 ein um 31%, an Tag 5 ein um 22% und an Tag 6 ein um 6% höheres Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen. Zuletzt wurden nochmals die Ergebnisse der t-Tests der einzelnen Tage in Tabelle 9 aufgeführt. Kein Tag zeigt ein signifikantes Ergebnis im t-Test.

	Tag 0	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
p-Werte	0,128	0,617	0,149	0,115	0,231

Tabelle 9: Aussaat von 800 Zellen pro Well, mit Zusatz von E2, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben, n=4



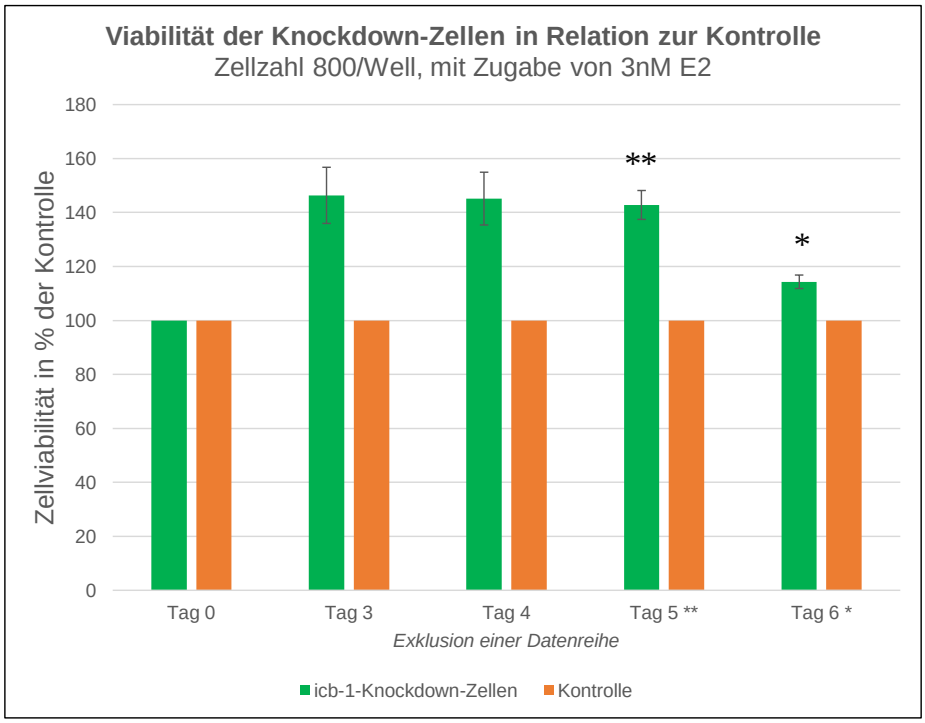


Abbildung 14: oben: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle über 7 Tage, unten: Darstellung der Zellproliferation in % in

Relation zur Kontrolle über 7 Tage, Aussaat von 800 Zellen pro Well, mit Zusatz von E2, Exklusion einer Datenreihe mit icb-1-Knockdown ≥ 20%, ein Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n=3

In Abbildung 14 ist schließlich nochmals der Versuchsansatzes mit 800 Zellen bei Aussaat an Tag 0 nach Exklusion einer Datenreihe, bei der ein icb-1-Knockdown von mehr als 20 % errechnet wurde, dargestellt. Im Vergleich zur Auswertung des Versuchsansatz mit Inklusion aller Daten zeigten sich hier an Tag 5 und Tag 6 signifikante Unterschiede im Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen und der Kontrolle. Abbildung 14 wurde auf dieselbe Weise aufgebaut wie die vorhergehenden Diagramme. Die grünen Balken repräsentieren die icb-1-Knockdown-Zellen und die orangen Balken die Kontrolle. Der standard error of the mean wurde jeweils als Fehlerbalken eingefügt. Im oberen Diagramm sind vertikal die absoluten Messwerte des CTB-Assays und horizontal die einzelnen Messzeitpunkte über 7 Tage aufgetragen. Im unteren Diagramm der Abbildung 14 ist dann wieder der Unterschied im Wachstum zwischen den icb-1-Knockdown-Zellen und der Kontrolle in Prozent dargestellt. Die Kontrolle ist auf 100 % am jeweiligen Tag normiert und dazu das Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen in Relation gesetzt. An Tag 5 ergibt sich ein um 43% und an Tag 6 ein um 14% höheres Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Im Folgenden werden nochmals die errechneten p-Werte nach Exklusion der Datenreihe zur Übersicht in einer Tabelle dargestellt.

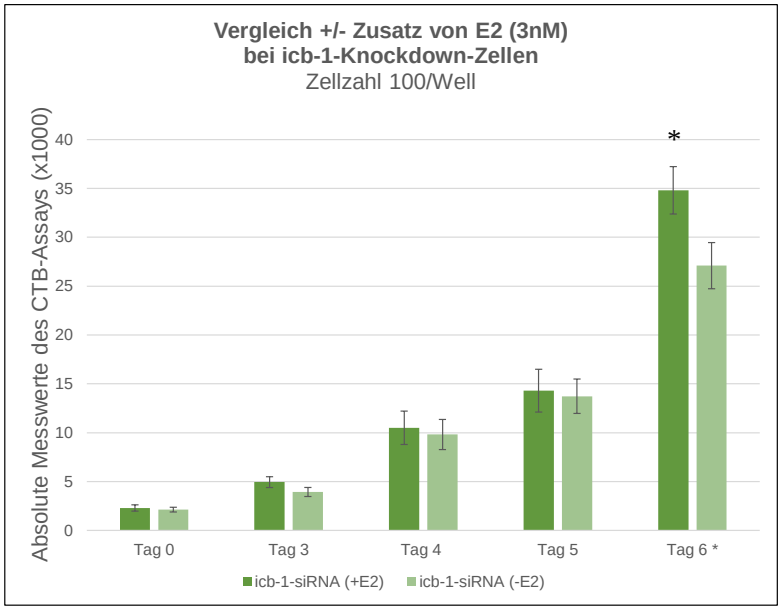
	Tag 0	**Tag 3**	**Tag 4**	**Tag 5**	**Tag 6**
p-Werte	0,446	0,066	0,065	*0,003*	*0,029*

Tabelle 10: Aussaat von 800 Zellen pro Well, mit Zusatz von E2, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben, Exklusion einer Datenreihe mit icb-1-Knockdown ≥ 20%, n=3

4.2.4 Auswertung des Effekts der Stimulation mit E2 auf das Zellwachstum der icb-1-Knockdown-Zellen

Zuletzt wurde der Einfluss der Zugabe von E2 auf das Wachstum der Zellen untersucht. Zunächst wurde hierfür die Auswirkung der Zugabe von E2 auf die Kontrollzellen verglichen. Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied in allen drei

Versuchsansätzen mit unterschiedlichen Zellzahlen. Demnach zeigte sich also kein signifikant niedrigeres oder höheres Wachstum der Kontrollzellen bei Stimulation mit E2. Ebenfalls wurde der Einfluss der Stimulation mit E2 auf die icb-1-Knockdown-Zellen verglichen. Hier konnte bei den Versuchsansätzen mit Aussaat von 200 und 800 Zellen an Tag 0 kein signifikanter Unterschied im Wachstum gezeigt werden. Jedoch zeigte sich beim Versuchsansatz mit 100 Zellen bei Aussaat ein Unterschied zwischen den stimulierten icb-1-Knockdown-Zellen und der Vergleichsgruppe. Dieser Sachverhalt ist im Folgenden in Abbildung 15 graphisch dargestellt.



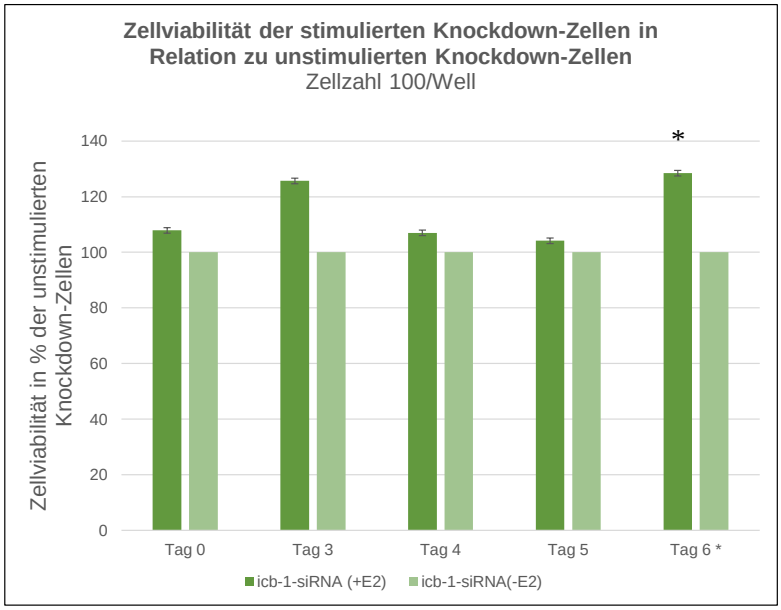


Abbildung 15: oben: Vergleich von +/- Zusatz von E2 bei icb-1-Knockdown-Zellen, Angabe des Mittelwerts ± SEM, ein Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis

(p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), unten: Darstellung der Zellproliferation der stimulierten icb-1-Knockdown-Zellen in % in Relation zu den nicht stimulierten icb-1-Knockdown-Zellen über 7 Tage, Aussaat von 100 Zellen pro Well, n=4

In Abbildung 15 zeigt das obere Diagramm das Wachstum der stimulierten icb-1-Knockdown-Zellen und der nicht stimulierten icb-1-Knockdown-Zellen im zeitlichen Verlauf von 7 Tagen (Tag 0 bis Tag 6). Auf der y-Achse sind hierbei die absoluten Messwerte des CTB-Assays in tausender Schritten aufgetragen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Messzeitpunkte in Tagen nach Aussaat aufgetragen. Der Tag der Aussaat der Zellen ist mit Tag 0 bezeichnet. Die dunkleren Balken stellen die icb-1-Knockdown-Zellen dar, die mit einer E2-Mischung stimuliert wurden. Die helleren Balken repräsentieren die nicht stimulierten icb-1-Knockdown-Zellen. Auch hier wurde zu jedem Datensatz jeweils der standard error of the mean errechnet und als Fehlerbalken in das Diagramm eingefügt. An den Tagen 3, 4 und 5 kann man optisch ein leicht höheres Wachstum der stimulierten icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zu der unstimulierten Vergleichsgruppe erkennen. An Tag 6 zeigt sich dann schließlich optisch ein deutlich höheres Wachstum der stimulierten icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zu den unstimulierten icb-1-Knockdown-Zellen. Dieser Unterschied ist ebenso signifikant. Der signifikante Unterschied wurde im Diagramm mit einem Sternchen verdeutlicht. Im unteren Diagramm der Abbildung 15 wurden nun die unstimulierten icb-1-Knockdown-Zellen am jeweiligen Tag auf 100% normiert und dann in Relation dazu das Wachstum der stimulierten icb-1-Knockdown-Zellen errechnet. Die dunkleren Balken repräsentieren hier wieder die stimulierten icb-1-Knockdown-Zellen und die helleren Balken die unstimulierten icb-1-Knockdown-Zellen. Auf der y-Achse wurde die Zellviabilität in Prozent in Relation zu den unstimulierten icb-1-Knockdown-Zellen aufgetragen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Messzeitpunkte aufgetragen. Ebenso wurde für die stimulierten icb-1-Knockdown-Zellen der standard error of the mean errechnet und im Diagramm als Fehlerbalken eingetragen. Auch hier wurde das signifikant höhere Wachstum der stimulierten icb-1-Knockdown-Zellen an Tag 6 mit einem Sternchen gekennzeichnet. An Tag 6 zeigt sich zum Beispiel ein um 28% höheres Wachstum der stimulierten icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zu den unstimulierten icb-1-Knockdown-Zellen. In Tabelle 11 sind schließlich nochmals die errechneten p-Werte der t-Tests der einzelnen Tage aufgelistet. In der oberen Zeile sind die Ergebnisse des Vergleichs von

stimulierten und unstimulierten Kontrollzellen dargestellt. Hierbei ergab sich wie bereits erläutert kein signifikanter Unterschied im Wachstum der Kontrollzellen. Von daher wurde auf eine graphische Darstellung verzichtet. In der unteren Zeile sind die Ergebnisse des Vergleichs der stimulierten und unstimulierten icb-1-Knockdown-Zellen aufgelistet. An Tag 6 ergab sich hierbei ein p-Wert von 0,03 im t-Test, was als signifikant gewertet wird.

p-Werte	**Tag 0**	**Tag 3**	**Tag 4**	**Tag 5**	**Tag 6**
Kontrolle (+/- E2)	0,73	0,65	0,51	0,12	0,82
icb-1-Knockdown-Zellen (+/- E2)	0,68	0,17	0,77	0,84	*0,03*

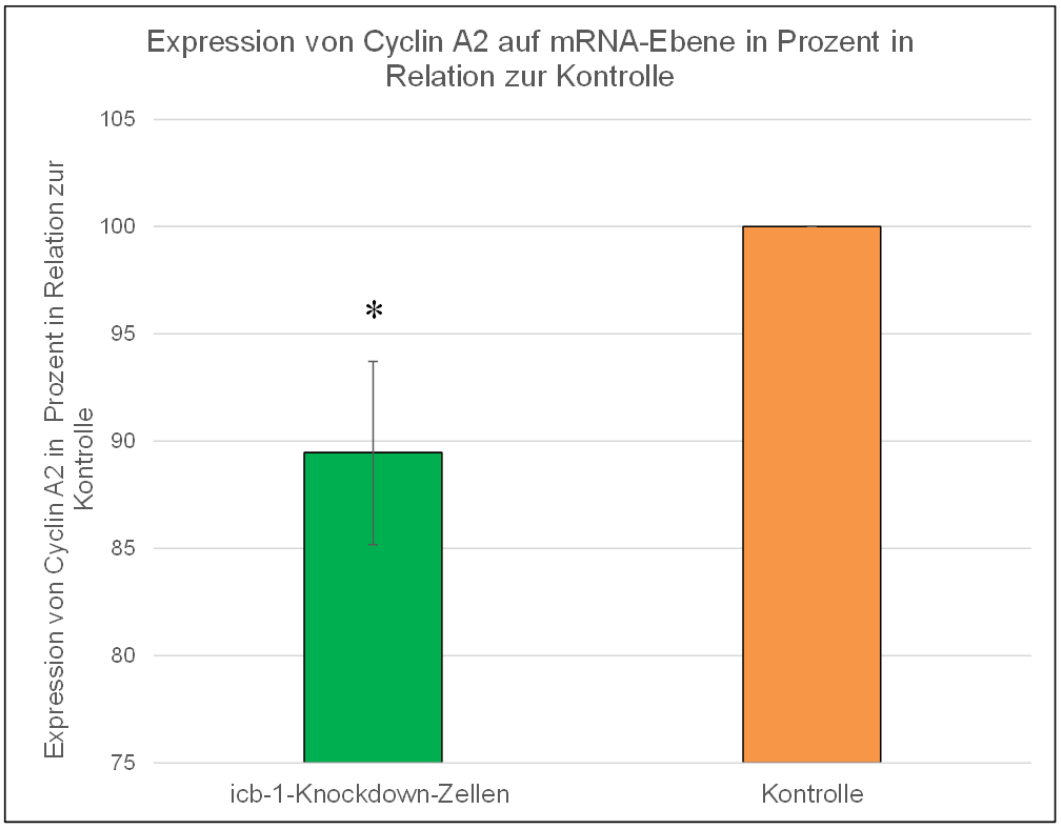
Tabelle 11: obere Zeile: errechnete p-Werte bei Vergleich von +/- Zusatz von E2 bei den Kontrollzellen, untere Zeile: errechnete p-Werte bei Vergleich von +/- Zusatz von E2 bei icb-1-Knockdown-Zellen, Aussaat von 100 Zellen pro Well, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben, n=4

4.2.5 Untersuchung der Expression Proliferations-assoziierter Gene auf mRNA-Ebene in icb-1-Knockdown-Zellen

Gen	**Expression der einzelnen Gene in icb-1-Knockdown-Zellen in Prozent in Bezug auf die Kontrolle [%]**	**p-Wert**
Cyclin A2	*89*	*0,016*
Cyclin D1	86	0,069
Cyclin E	*134*	*0,017*
Ki 67	91	0,096
ER β	114	0,352

Tabelle 12: Auflistung der untersuchten Gene, Expression der einzelnen Gene auf mRNA-Ebene in icb-1-Knockdown-Zellen in Prozent [%] in Bezug auf die Kontrolle, berechnete p-Werte im t-Test, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben

Die transfizierten Zellen wurden außerdem für die Analyse der Expression verschiedener Gene auf mRNA-Ebene genutzt. Die gewonnene RNA wurde dabei wiederum in cDNA übersetzt. Bei der nachfolgenden quantitativen RT-PCR wurden dann die verschiedenen Primer der zu untersuchenden Gene hinzugefügt. So konnte schließlich quantitativ auf die Expression der Gene in icb-1-Knockdown-Zellen beziehungsweise der Kontrolle rückgeschlossen werden. Es wurden insgesamt fünf Gene untersucht. Diese waren Cyclin D1, Cyclin A2, Cyclin E, Ki 67 und ER β. Die Analyse der Gene Cyclin D1, Ki 67 und ER β zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Genexpression auf mRNA-Ebene zwischen den icb-1-Knockdown-Zellen und der Kontrolle. Hingegen zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei der Expression der Gene Cyclin E und Cyclin A2 in den icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. In Tabelle 12 wurden die untersuchten Gene, die dazugehörigen Ergebnisse des t-Tests und die errechnete Expression des Gens in icb-1-Knockdown-Zellen in Prozent in Relation zur Kontrolle aufgelistet. Ein p-Wert < 0,05 im t-Test wurde als signifikant gewertet.



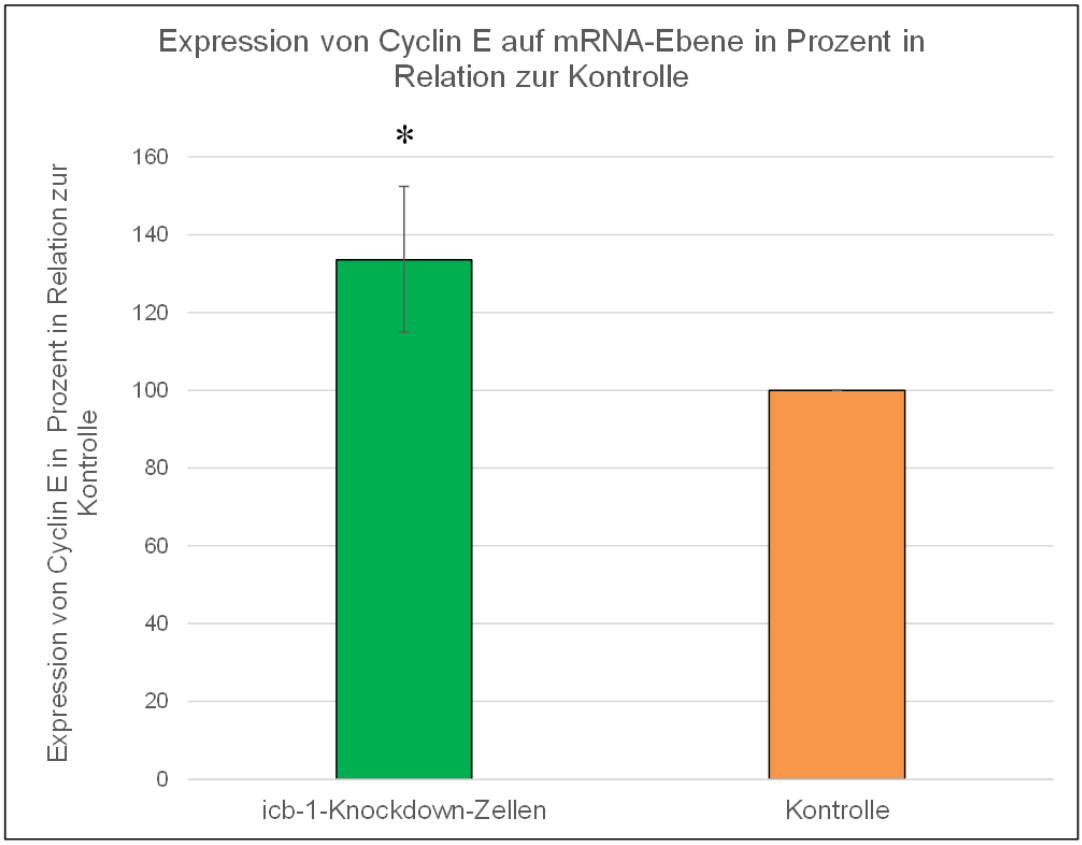


Abbildung 16: oben: Darstellung der Genexpression von Cyclin A2 auf mRNA-Ebene in icb-1-Knockdown-Zellen in % in Relation zur Kontrolle; unten: Darstellung der Genexpression von Cyclin E auf mRNA-Ebene in icb-1-Knockdown-Zellen in % in Relation zur Kontrolle; ein Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05)

In Abbildung 16 wurden die signifikanten Ergebnisse der Gene Cyclin A2 und Cyclin E nochmals graphisch dargestellt. Im oberen Diagramm sind die Ergebnisse der Genanalyse von Cyclin A2 dargestellt, unten die von Cyclin E. Die beiden Diagramme zeigen jeweils die Expression des Gens auf mRNA-Ebene in Prozent in Relation zur Kontrolle. Der grüne Balken stellt dabei die icb-1-Knockdown-Zellen dar. Der orange Balken repräsentiert die Kontrolle. Auf der y-Achse sind die Prozent bezogen auf die Kontrolle dargestellt. In icb-1-Knockdown-Zellen wird das Gen Cyclin A2 auf mRNA-Ebene zu 89% exprimiert in Bezug zur Kontrolle. Demnach wird also 11% weniger Cyclin A2 in icb-1-Knockdown-Zellen exprimiert als in den Kontrollzellen. Bei der Untersuchung der Expression von Cyclin E zeigte sich ein genau entgegengerichtetes Verhalten. Hier wurde eine Expression von Cyclin E von 134% in icb-1-Knockdown-

Zellen im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Das heißt, dass Cyclin E um 34% mehr als in den Kontrollzellen exprimiert wird.

5. Diskussion

5.1 Inhibierender Einfluss von icb-1 auf das zelluläre Wachstum der Zelllinie HEC-1B

Es kann ein inhibierender Einfluss von icb-1 auf das Wachstum der Zelllinie HEC-1B nachgewiesen werden. Bei den Experimenten ohne Stimulation mit E2 konnte an Tag 5 nach Aussaat in jeder Versuchsreihe ein signifikant höheres Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle errechnet werden (siehe Abbildung 5). Bei der Versuchsreihe mit 100 Zellen bei Aussaat an Tag 0 beträgt der p-Wert im t-Test 0,004, was als hoch signifikantes Ergebnis ($p<0,01$) gewertet wird. Ebenso konnte bei der Versuchsreihe mit 200 Zellen bei Aussaat an Tag 0 ein signifikantes Ergebnis ($p<0,05$) gezeigt werden. Hier beträgt der p-Wert 0,01 im t-Test an Tag 5. Schließlich wurde auch bei der Versuchsreihe mit 800 Zellen bei Aussaat ein signifikantes Ergebnis ($p<0,05$) erzielt. Der p-Wert betrug 0,02 im t-Test an Tag 5. Bei allen drei Versuchsansätzen war der Unterschied im Wachstum am Folgetag (Tag 6) nicht mehr signifikant. Dies wird im Rahmen des transienten Knockdowns von icb-1 gedeutet.

Außerdem wurde das Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen und der Kontrolle unter Stimulation mit E2 verglichen. Hier zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede im Wachstum, jedoch weniger eindeutig. Bei der Versuchsreihe mit 200 Zellen bei Aussaat an Tag 0 konnte wie bei der Versuchsreihe ohne Stimulation mit E2 an Tag 5 ein signifikant höheres Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Der p-Wert betrug 0,027 an Tag 5. Des Weiteren wurde bei der Versuchsreihe mit 100 Zellen bei Aussaat ein signifikant höheres Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen am Tag 6 erzielt. Der p-Wert betrug hier 0,009 an Tag 6 und ist somit als hoch signifikant zu werten.

Bei der Auswertung der Versuchsreihe mit Aussaat von 800 Zellen pro Well an Tag 0 wurde eine Wiederholung ausgeschlossen, da der ermittelte Knockdown nicht der Zielsetzung von ≤ 20% entsprach. Dennoch wurde ein grenzwertig ausreichender Knockdown von 20,6% bei dem ausgeschlossenen Versuch erzielt. Bei der Auswertung der Ergebnisse flossen demnach nur drei statt vier Wiederholungen der Versuchsreihe ein. Der Datensatz, der in die Auswertung mit einfloss, verringerte sich demnach. Dies senkt die Reliabilität der Ergebnisse. Nach Exklusion der

Versuchsreihe zeigte sich ohne Stimulation mit E2 an drei Tagen und mit Stimulation mit E2 an zwei Tagen ein signifikanter Unterschied. Bei Inklusion aller gemessener Daten zeigte sich hingegen bei Stimulation mit E2 kein signifikantes Ergebnis. Jedoch zeigte sich auch bei Inklusion des grenzwertig zu hohen Knockdowns ein signifikantes Ergebnis an Tag 5 bei der Versuchsreihe ohne Zugabe von E2. Dies würde wiederum die Validität der Ergebnisse unterstreichen, da dennoch ein signifikantes Ergebnis erzielt wurde.

Die nicht signifikanten Ergebnisse, die im Rahmen der Versuche zur Optimierung der Transfektionseffizienz entstanden sind, werden durch einen unzureichenden Knockdown der Expression von icb-1 begründet. SiLentFect hat sich hierbei nicht als geeignetes Transfektionsreagenz für die Versuche herausgestellt. Für eine detaillierte Erläuterung zu den Vorversuchen vergleiche man Kapitel 4.1.

5.2 Übereinstimmung der Ergebnisse mit Erkenntnissen bei Ovarialkarzinomzellen und Brustkrebszellen

In einer vergleichbaren Arbeit unserer Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2013 [15] konnte ebenfalls die Rolle von icb-1 als Tumorsuppressorgen in Ovarialkarzinomzellen bestätigt werden. Der Versuchsaufbau gleicht dem dieser Arbeit. Die Auswirkung eines Knockdowns von icb-1 wurde auch hier mit Hilfe von Transfektion mit shRNA und anschließendem Zellproliferationsassay untersucht. Das Experiment wurde an den drei Ovarialkarzinomzelllinien SK-OV-3, OAW-42 und OVCAR-3 durchgeführt. Der Knockdown von icb-1 beschleunigte das Wachstum aller drei Ovarialkarzinomzelllinien im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Dies entspricht den Ergebnissen an HEC-1B-Zellen in dieser Arbeit. Das heißt, dass icb-1 die gleiche Funktion in den untersuchten Tumorentitäten einimmt. Darüber hinaus wurde noch die Expression verschiedener Krebs-assoziierter Gene in oben genannter Arbeit [15] untersucht. Hier wurde unter anderem eine Hochregulierung der Gene CLDN 16 (claudin 16) und KLK10 (kallikrein-related peptidase 10), welche eine Rolle in der Progression der onkogenetischen Transformation der untersuchten Ovarialkarzinomzellen spielen, beobachtet. Eine ähnliche Auswirkung des Knockdowns von icb-1 in HEC-1B-Zellen wäre denkbar, wurde jedoch in dieser Arbeit nicht untersucht.

In einer weiteren Arbeit unserer Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2020 [28] wurde der Effekt eines Knockdowns von icb-1 in Brustkrebszellen untersucht. Es wurde dieselbe Methodik für das Knockdown-Experiment genutzt. Als Brustkrebszelllinie wurde die Zelllinie T-47-D verwendet. Auch hier konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown von icb-1 in den T-47-D-Zellen zu einer beschleunigten Proliferation gegenüber der Kontrolle führt. Der signifikante Unterschied im Wachstum zeigte sich in dieser Arbeit an Tag 4 und Tag 5 nach Aussaat.

Schließlich zeigt eine weitere Arbeit unserer Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2010 [17] dieselben Effekte auf Brust- und Ovarialkrebszellen. Hier wurden die Zelllinien MCF-7 und SKOV-3 untersucht. Auch hier zeigte sich ein beschleunigtes Wachstum der Zellen nach Knockdown von icb-1.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Funktion von icb-1 in allen drei untersuchten Tumorentitäten gleichgerichtet scheint. Icb-1 fungiert jeweils als Tumorsuppressorgen. Demnach führt ein Knockdown von icb-1 zu einem beschleunigten Wachstum der Krebszellen.

5.3 Effekt des icb-1 Knockdowns auf die Proliferation der Zellen bei Zugabe von 17-β-Östradiol

Ältere Untersuchungen zur Charakterisierung von Zelllinien endometrialer Adenokarzinome haben ergeben, dass diese keine Steigerung der Proliferation bei Zugabe von Östrogenen zeigen. Diese Zelllinien sind demnach nicht sensibel gegenüber Östrogenen [29], [30]. In dieser Arbeit wurde dieses Verhalten nochmals bestätigt. Durch Vergleich des Wachstums der Kontrollzellen einmal mit Zugabe von E2 und einmal ohne Zugabe von E2. Hier ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Proliferationsgeschwindigkeit. Die Zugabe von E2 hatte also keinen Effekt auf die Proliferation der HEC-1B-Zellen.

Nach Knockdown von icb-1 zeigte sich bei Zusatz von E2 bei einer Versuchsreihe (siehe 4.2.4) ein signifikanter Unterschied an Tag 6 im Vergleich zu den icb-1-Knockdown-Zellen, die nicht mit E2 behandelt wurden. Hier zeigte sich ein höheres Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen bei Zugabe von E2. Bei den Kontrollzellen mit und ohne Stimulation mit E2 zeigte sich kein Wachstumsunterschied. Daraus kann

man schließen, dass erst der Knockdown von icb-1 zu einer Östrogen-getriggerten Beschleunigung der Proliferation der HEC-1B-Zellen führte. Dies könnte daraufhin deuten, dass icb-1 eine antagonistische Wirkung auf die Östrogenempfindlichkeit der endometrialen Adenokarzinomzellen ausübt. In einer vergleichbaren Arbeit an Ovarial- und Brustkrebszellen aus dem Jahr 2010 unserer Arbeitsgruppe [17] konnte ein ähnlicher Effekt gezeigt werden. Hier wurde ebenfalls ein Zellproliferationsassay mit und ohne Zugabe von E2 durchgeführt. Die Versuche mit Brustkrebszellen (Zelllinie MCF-7) führten bei Zugabe von E2 zu einer beschleunigten Proliferation der icb-1-Knockdown-Zellen und der entsprechenden Kontrolle. Die relative Proliferationssteigerung entsprach jedoch der unstimulierten Vergleichsgruppe. Das heißt, dass der Knockdown von icb-1 scheinbar nicht zu einer wesentlichen Beschleunigung der Proliferation der MCF-7-Zellen beiträgt. Die Versuche an den Ovarialkrebszellen (Zelllinie SK-OV-3) führten ebenfalls zu einer gesteigerten Proliferation nach Zugabe von E2. Das Wachstumsverhalten der Kontrollzellen war jedoch hier mit und ohne Stimulation mit E2 gleich. Nach Zugabe von E2 wuchsen die icb-1-Knockdown-Zellen signifikant schneller als die nicht stimulierten icb-1-Knockdown-Zellen. Dieses Experiment zeigte, dass erst der Knockdown von icb-1 eine Östrogenempfindlichkeit der SK-OV-3-Zellen und dann eine Östrogen-getriggerte Proliferation ermöglichte. In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von icb-1 zu einer Erhöhung von ER α in MCF-7-Zellen und SK-OV-3-Zellen führte.

Jedoch ist anzumerken, dass dieses Resultat nicht bei den Versuchsreihen mit Aussaat von 800 Zellen und 200 Zellen reproduziert werden konnte. Dies könnte daran liegen, dass die Zellzahlen zu Beginn zu hoch gewählt wurden, um einen klaren Effekt auf die Proliferation zeigen zu können. Des Weiteren wurde die Konzentration von E2 nicht variiert. Höhere Konzentrationen könnten deutlichere Effekte auf die Proliferation der icb-1-Knockdown-Zellen zeigen. Diese beiden Versuchsparameter könnten in einer weiteren Arbeit optimiert werden.

5.4 Analyse der Expression Proliferations-assoziierter Gene auf mRNA-Ebene bei Knockdown von icb-1

Die Cycline A, D und E sind essentiell für den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus.

Der Knockdown von icb-1 hatte auf die Proliferationsgene Cyclin A2, Cyclin E und Cyclin D1 einen uneinheitlichen Einfluss. Bei Knockdown von icb-1 kam es zu einer erniedrigten Expression von Cyclin A2, bei Cyclin E zu einer erhöhten Genexpression und zu einer unveränderten Expression von Cyclin D2 im Vergleich zur Kontrolle. Die erhöhte Expression von Cyclin E könnte das erhöhte Wachstum der endometrialen Adenokarzinomzellen bei Knockdown von icb-1 erklären.

Ki 67 ist ein nukleares Protein, welches insbesondere in Brustkrebszellen während der Zellproliferation exprimiert wird. Ruhende Zellen, die sich in der G0-Phase des Zellzyklus befinden, exprimieren kein Ki 67. In proliferativen Zellen wird hingegen Ki 67 universell exprimiert [31].

Östrogene wirken in den entsprechenden Zielgeweben hauptsächlich über die zwei Östrogenrezeptoren (ER) α und β. Die Expression und die Funktion der beiden Östrogenrezeptoren kann sich dabei in den Geweben unterscheiden [32].

Die Expression von Ki 67 und ER β wird scheinbar nicht durch icb-1 beeinflusst, da bei Knockdown von icb-1 im Vergleich zu der Kontrolle kein signifikanter Unterschied gezeigt wurden konnte.

In anderen Arbeiten konnte ebenfalls ein Einfluss von icb-1 auf die Expression Proliferations-assoziierter Gene nachgewiesen werde. In einer Arbeit an Ovarialkarzinomzellen aus dem Jahr 2013 [15] konnte eine Induktion von Cyclin A1 nachgewiesen werden. Der Knockdown von icb-1 in SK-OV-3-Zellen bewirkte eine verdoppelte Expression von Cyclin A1. Dies steht im Einklang mit der Erkenntnis, dass ein Knockdown von icb-1 zu einem vermehrten Wachstum von SK-OV-3-Zellen führt.

In einer weiteren Arbeit unserer Forschungsgruppe wurde gezeigt, dass ein Knockdown von icb-1 zu einer Steigerung der Proliferation in Brustkrebszellen (T-47-D-Zellen) führt. Zudem konnte eine Östrogen-getriggerte verstärkte Proliferation der icb-1-Knockdown-Zellen durch Hochregulation der Expression von ERα auf mRNA-

Ebene nachgewiesen werden. Schließlich bewirkte der Knockdown von icb-1 in T-47-D Zellen ebenso eine erhöhte Expression auf mRNA-Ebene der Proliferationsgene CyclinA2, CyclinD1 und Ki67 im Vergleich zur Kontrolle nach Behandlung mit Östrogenen [28].

5.5 Experimentelle Limitationen

Im Nachfolgenden wird auf die experimentelle Limitation des Experiments eingegangen:

Die vorliegenden Daten wurden nur aus Versuchen an der Zelllinie HEC-1B generiert. Für eine verbesserte Aussagekraft hätten zusätzlich Daten an einer weiteren Zelllinie endometrialer Adenokarzinomzellen wie beispielsweise RL-95-2 erhoben werden müssen. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, wobei jedoch leider kein ausreichender Knockdown erzielt werden konnte.

6. Zusammenfassung

Das Gen icb-1 („induced by contact to basement membrane 1“) ist in Differenzierungsprozesse von Krebszellen involviert und nimmt eine wichtige Rolle in Proliferationsprozessen, Apoptoseverhalten und Progression gynäkologischer Tumore ein.

In dieser Arbeit wurde ein transienter Knockdown der Expression von icb-1 in der Zelllinie HEC-1B durch Transfektion mit spezifischer siRNA durchgeführt. Der Erfolg und Zeitverlauf des Knockdowns wurde in einem Timecourse Experiment 72h und 96h nach Transfektion auf mRNA Ebene (qPCR) untersucht. Dabei erfolgte der Knockdown im Vergleich zu Zellen, die mit einer negativen Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Es wurde anschließend der Effekt des icb-1 Knockdowns auf die relative Zahl viabler Zellen 4 bis 7 Tage nach der Transfektion mit Hilfe eines CTB-Assays untersucht (CellTiter-Blue® Kit, Promega).

Zusammenfassend zeigte sich bei den Proliferationsexperimenten ein signifikant schnelleres Wachstum der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der zu Beginn postulierten Hypothese, dass icb-1 eine Funktion als Tumorsuppressor ausübt.

Schließlich wurde das Wachstum der mit Östrogen stimulierten icb-1-Knockdown-Zellen mit den unstimulierten icb-1-Knockdown-Zellen verglichen, um den isolierten Einfluss von Östrogenen auf die Proliferation von icb-1-Knockdown-Zellen zu untersuchen. Hier zeigte sich bei der Versuchsreihe mit 100 Zellen bei Aussaat ein höheres Wachstum bei Knockdown von icb-1 und Stimulation mit Östrogenen. Dies führt zur Vermutung, dass eine verstärkte östrogenabhängige Proliferation der endometrialen Adenokarzinomzellen durch die Expression von icb-1 unterbunden wird.

Schließlich wurde noch die Expression verschiedener Proliferations-assoziierter Gene auf mRNA-Ebene in icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen untersucht. Bei Knockdown von icb-1 kam es zu einer erhöhten Genexpression von Cyclin E. Die erhöhte Expression von Cyclin E auf mRNA-Ebene steht dabei im Einklang mit den Ergebnissen der Zellproliferationsassays.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Hypothese, dass icb-1 in endometrialen Adenokarzinomzellen eine Funktion als Tumorsuppressorgen ausübt.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der cDNA des humanen Gens icb-1, Raute: Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase C, Dreieck: Phosphorylierungsstelle für die Caseinkinase II, Quadrat: N-Myristoylierungsstelle, Kreis: Amidierungsstelle, Kasten: Zwei 4-gliedrige Nuclear-Targeting Patterns, Fett: Polyadenylierungssignal [10] 14
Abbildung 2: schematische Darstellung einer 96-Well-Platte und die Systematik der Anordnung der Aussaat der unterschiedlich transfizierten Zellen und des Blanks auf der 96-Well-Platte 24
Abbildung 3: graphische Darstellung des icb-1-Knockdown nach 72h, 96h und 120h, Darstellung des Mittelwerts ± SEM, Angabe des Knockdowns in %, ein Sternchen (*) markiert ein signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren ein hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n=7 32
Abbildung 4: graphische Darstellung des icb-1-Knockdown nach 72h und 96h, Darstellung des Mittelwerts ± SEM, Angabe des Knockdowns in %, ein Sternchen (*) markiert ein signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren ein hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), getrennte Darstellung des mittleren Knockdowns der einzelnen Versuchsansätze mit den unterschiedlichen Zellzahlen 100, 200 und 800 bei Aussaat an Tag 0, n(100)=4, n(200)=5, n(800)=4 34
Abbildung 5: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle an den einzelnen Tagen nach Aussaat, Darstellung der unterschiedlichen Versuchsansätze mit unterschiedlichen Zellzahlen gemeinsam in einem Diagramm zu einem bestimmten Zeitpunkt, Inklusion aller Daten, Darstellung des Mittelwerts ± SEM, Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n(100)=4, n(200)=5, n(800)=4 37
Abbildung 6: oben: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle über 7 Tage, unten: Darstellung der Zellproliferation in % in Relation zur Kontrolle über 7 Tage, Aussaat von 100 Zellen pro Well an Tag 0, ein

Sternchen (*) markiert ein signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren ein hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n=4 38
Abbildung 7: oben: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle über 7 Tage, unten: Darstellung der Zellproliferation in % in Relation zur Kontrolle über 7 Tage, Aussaat von 200 Zellen pro Well, ein Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n=5 40
Abbildung 8: oben: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle über 7 Tage, unten: Darstellung der Zellproliferation in % in Relation zur Kontrolle über 7 Tage, Aussaat von 800 Zellen pro Well, ein Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n=4 42
Abbildung 9: oben: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle über 7 Tage, unten: Darstellung der Zellproliferation in % in Relation zur Kontrolle über 7 Tage, Aussaat von 800 Zellen pro Well, Exklusion einer Datenreihe mit icb-1-Knockdown ≥ 20%, ein Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n=3 44
Abbildung 10: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle an den einzelnen Tagen, Darstellung der unterschiedlichen Versuchsansätze mit unterschiedlichen Zellzahlen an Tag 0, mit Zugabe von E2, Inklusion aller Daten, Darstellung des Mittelwerts ± SEM, Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n(100)=4, n(200)=5, n(800)=4 47
Abbildung 11: oben: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle über 7 Tage, unten: Darstellung der Zellproliferation in % in Relation zur Kontrolle über 7 Tage, Aussaat von 100 Zellen pro Well, mit Zusatz von E2, ein Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n=4 48
Abbildung 12: oben: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle über 7 Tage, unten: Darstellung der Zellproliferation in % in Relation zur Kontrolle über 7 Tage, Aussaat von 200 Zellen pro Well, mit Zusatz von E2, ein Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n=5 49

Abbildung 13: oben: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle über 7 Tage, unten: Darstellung der Zellproliferation in % in Relation zur Kontrolle über 7 Tage, Aussaat von 800 Zellen pro Well, mit Zusatz von E2, ein Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n=4 51
Abbildung 14: oben: Darstellung der Zellproliferation der icb-1-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle über 7 Tage, unten: Darstellung der Zellproliferation in % in Relation zur Kontrolle über 7 Tage, Aussaat von 800 Zellen pro Well, mit Zusatz von E2, Exklusion einer Datenreihe mit icb-1-Knockdown ≥ 20%, ein Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), n=3 52
Abbildung 15: oben: Vergleich von +/- Zusatz von E2 bei icb-1-Knockdown-Zellen, Angabe des Mittelwerts ± SEM, ein Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05), zwei Sternchen (**) markieren hoch signifikantes Ergebnis (p<0,01), unten: Darstellung der Zellproliferation der stimulierten icb-1-Knockdown-Zellen in % in Relation zu den nicht stimulierten icb-1-Knockdown-Zellen über 7 Tage, Aussaat von 100 Zellen pro Well, n=4 54
Abbildung 16: oben: Darstellung der Genexpression von Cyclin A2 auf mRNA-Ebene in icb-1-Knockdown-Zellen in % in Relation zur Kontrolle; unten: Darstellung der Genexpression von Cyclin E auf mRNA-Ebene in icb-1-Knockdown-Zellen in % in Relation zur Kontrolle; ein Sternchen (*) markiert signifikantes Ergebnis (p<0,05) .. 58

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Histopathologische Klassifikation des Endometriumkarzinoms [4], [5]..... 10
Tabelle 2: Die neue (2010) FIGO-/ TNM-Klassifikation des Endometriumkarzinoms [9], ... 11
Tabelle 3: Aussaat von 100 Zellen pro Well, ohne Zusatz von E2, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben, n=4 39
Tabelle 4: Aussaat von 200 Zellen pro Well, ohne Zusatz von E2, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben, n=5 41
Tabelle 5: Aussaat von 800 Zellen pro Well, ohne Zusatz von E2, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben, n=4 43
Tabelle 6: Aussaat von 800 Zellen pro Well, ohne Zusatz von E2, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben, Exklusion einer Datenreihe mit icb-1-Knockdown ≥ 20%, n=3 45
Tabelle 7: Aussaat von 100 Zellen pro Well, mit Zusatz von E2, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben, n=4 49
Tabelle 8: Aussaat von 200 Zellen pro Well, mit Zusatz von E2, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben, n=5 50
Tabelle 9: Aussaat von 800 Zellen pro Well, mit Zusatz von E2, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben, n=4 52
Tabelle 10: Aussaat von 800 Zellen pro Well, mit Zusatz von E2, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben, Exklusion einer Datenreihe mit icb-1-Knockdown ≥ 20%, n=3 53
Tabelle 11: obere Zeile: errechnete p-Werte bei Vergleich von +/- Zusatz von E2 bei den Kontrollzellen, untere Zeile: errechnete p-Werte bei Vergleich von +/- Zusatz von E2 bei icb-1-Knockdown-Zellen, Aussaat von 100 Zellen pro Well, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben, n=4 56
Tabelle 12: Auflistung der untersuchten Gene, Expression der einzelnen Gene auf mRNA-Ebene in icb-1-Knockdown-Zellen in Prozent [%] in Bezug auf die Kontrolle, berechnete p-Werte im t-Test, p-Werte < 0,05 graphisch hervorgehoben..... 56

7.3 Abkürzungsverzeichnis

SEM	standard error of the mean
EIN	endometriale intraepitheliale Neoplasie
TNF	tumor necrosis factor
LPS	Lipopolysaccharid
icb-1	induced by contact to basement membrane 1
E2	17-β-Östradiol
WHO	World Health Organization
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
ERE	estrogen response element
ER α	estrogen receptor α
ER β	estrogen receptor β
PCO-Syndrom	polyzystisches Ovarialsyndrom
HNPCC	hereditary non-polyposis colorectal cancer
THEMIS 1	thymocyte selection associated family member 1
THEMIS 2	thymocyte selection associated family member 2
DMEM	Dulbecco’s modified Eagle’s medium
FKS	fetales Kälberserum
DMSO	Dimethylsulfoxid
siRNA	small interfering RNA
dsDNA	doppelsträngige DNA
PCR	polymerase chain reaction
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
mRNA	messenger RNA

GFP	grün fluoreszierendes Protein
shRNA	small hairpin RNA
SNP	single nucleotide polymorphism
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
RISC	RNA-induced silencing complex
TNM	TNM Classification of Malignant Tumors
	Tumor, Nodes (Lymphknoten), Metastasen

Einheiten:

µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
nM	Nanomolar
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
h	Stunde
°C	Celsius

References

1. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland für 2015/2016. 12th ed. Berlin; 2019.
2. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientinnen mit Endometriumkarzinom: Langversion 1.0, 2018, AWMF Registernummer: 032/034-OL [cited 2020 Jul 22]. Available from: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/endometriumkarzinom/.
3. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. Gynecol Oncol. 1983;15(1):10–7. doi: 10.1016/0090-8258(83)90111-7. PubMed PMID: 6822361.
4. Zaino, R., S.G. Carinelli, and L.H. Ellenson, editor. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Tract.
5. Kurman, R.J., et al., WHO classification of tumours of female reproductive organs. World Health Organization classification of tumours, 4th edition ed. W.H.O. International Agency for Research on Cancer. 2014, Lyon: IARC Press.
6. Huang GS, Gebb JS, Einstein MH, Shahabi S, Novetsky AP, Goldberg GL. Accuracy of preoperative endometrial sampling for the detection of high-grade endometrial tumors. Am J Obstet Gynecol. 2007;196(3):243.e1-5. doi: 10.1016/j.ajog.2006.09.035. PubMed PMID: 17346538.
7. Leitao MM, Kehoe S, Barakat RR, Alektiar K, Gattoc LP, Rabbitt C, et al. Accuracy of preoperative endometrial sampling diagnosis of FIGO grade 1 endometrial adenocarcinoma. Gynecol Oncol. 2008;111(2):244–8. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.07.033. PubMed PMID: 18752842.
8. Clark TJ, Mann CH, Shah N, Khan KS, Song F, Gupta JK. Accuracy of outpatient endometrial biopsy in the diagnosis of endometrial cancer: A systematic quantitative review. BJOG. 2002;109(3):313–21. doi: 10.1111/j.1471-0528.2002.01088.x. PubMed PMID: 11950187.
9. TNM-Klassifikation maligner Tumoren. Endometriumkarzinom. 7th ed. TNM-Klassifikation maligner Tumoren, ed. Wittekind C. and H.J. Meyer. 2010, Weinheim: Wiley-VCH.
10. Treeck O, Strunck E, Vollmer G. A novel basement membrane-induced gene identified in the human endometrial adenocarcinoma cell line HEC1B. FEBS Lett.

1998;425(3):426–30. doi: 10.1016/s0014-5793(98)00278-6. PubMed PMID: 9563507.

11. Treeck O, Odani T, Itoh N, Imai H, Fujita S, Kohroki J, et al. Detection of increased icb-1 transcript levels in maturing HL-60 cells: A novel marker for granulocytic and monocytic in vitro differentiation. Leuk Res. 2002;26(8):765–9. doi: 10.1016/s0145-2126(02)00005-x. PubMed PMID: 12191572.
12. Johnson AL, Aravind L, Shulzhenko N, Morgun A, Choi S-Y, Crockford TL, et al. Themis is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection. Nat Immunol. 2009;10(8):831–9. doi: 10.1038/ni.1769. PubMed PMID: 19597497.
13. Peirce MJ, Brook M, Morrice N, Snelgrove R, Begum S, Lanfrancotti A, et al. Themis2/ICB1 is a signaling scaffold that selectively regulates macrophage Toll-like receptor signaling and cytokine production. PLoS ONE. 2010;5(7):e11465. doi: 10.1371/journal.pone.0011465. PubMed PMID: 20644716.
14. Treeck O, Belgutay D, Häring J, Schüler S, Lattrich C, Ortmann O. Network analysis of icb-1 gene function in human breast cancer cells. J Cell Biochem. 2012;113(9):2979–88. doi: 10.1002/jcb.24175. PubMed PMID: 22565810.
15. Treeck O, Schüler S, Häring J, Skrzypczak M, Lattrich C, Ortmann O. icb-1 Gene counteracts growth of ovarian cancer cell lines. Cancer Lett. 2013;335(2):441–6. doi: 10.1016/j.canlet.2013.02.049. PubMed PMID: 23474491.
16. Bollmann J, Ortmann O, Treeck O. Expression of differentiation-associated gene icb-1 is estrogen-responsive in ovarian and breast cancer cell lines. J Steroid Biochem Mol Biol. 2008;109(1-2):16–21. doi: 10.1016/j.jsbmb.2007.12.007. PubMed PMID: 18206364.
17. Konwisorz A, Springwald A, Haselberger M, Goerse R, Ortmann O, Treeck O. Knockdown of ICB-1 gene enhanced estrogen responsiveness of ovarian and breast cancer cells. Endocr Relat Cancer. 2010;17(1):147–57. doi: 10.1677/ERC-09-0095. PubMed PMID: 19942713.
18. Treeck O, Kindzorra I, Pauser K, Treeck L, Ortmann O. Expression of icb-1 gene is interferon-gamma inducible in breast and ovarian cancer cell lines and affects the IFN gamma-response of SK-OV-3 ovarian cancer cells. Cytokine. 2005;32(3-4):137–42. doi: 10.1016/j.cyto.2005.08.008. PubMed PMID: 16219472.
19. Schüler S, Lattrich C, Skrzypczak M, Fehm T, Ortmann O, Treeck O. Icb-1 gene polymorphism rs1467465 is associated with susceptibility to ovarian cancer. J

Ovarian Res. 2014;7:42. doi: 10.1186/1757-2215-7-42. PubMed PMID: 24826199.

20. Springwald A, Lattrich C, Seitz S, Ortmann O, Treeck O. Single nucleotide polymorphisms in human gene icb-1 and breast cancer susceptibility. Cancer Invest. 2009;27(6):669–72. doi: 10.1080/07357900802620877. PubMed PMID: 19308812.
21. Haselberger M, Springwald A, Konwisorz A, Lattrich C, Goerse R, Ortmann O, et al. Silencing of the icb-1 gene inhibits the induction of differentiation-associated genes by vitamin D3 and all-trans retinoic acid in gynecological cancer cells. Int J Mol Med. 2011;28(1):121–7. doi: 10.3892/ijmm.2011.663. PubMed PMID: 21455565.
22. Springwald A, Lattrich C, Skrzypczak M, Goerse R, Ortmann O, Treeck O. Icb-1 Gene expression is elevated in human endometrial adenocarcinoma and is closely associated with HER2 expression. Cancer Invest. 2010;28(9):904–9. doi: 10.3109/07357907.2010.483511. PubMed PMID: 20569072.
23. Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, Chin JE, Wunder JS, Andrulis IL, et al. Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(18):7160–4. doi: 10.1073/pnas.87.18.7160. PubMed PMID: 1976252.
24. Murphy LD, Herzog CE, Rudick JB, Fojo AT, Bates SE. Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of mdr-1 gene expression. Biochemistry. 1990;29(45):10351–6. doi: 10.1021/bi00497a009. PubMed PMID: 1979752.
25. Horikoshi T, Danenberg KD, Stadlbauer TH, Volkenandt M, Shea LC, Aigner K, et al. Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase, and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction. Cancer Res. 1992;52(1):108–16. PubMed PMID: 1727369.
26. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PubMed PMID: 11846609.
27. Moravec R, Riss T. The CELLTITER-BLUE™ CELL VIABILITY ASSAY: Monitoring cell viability using a fluorescent redox indicator dye [Internet]. 2003 [cited 21 March 2021]. Available from: https://www.promega.kr/-/media/files/resources/cell-notes/cn005/the-celltiter-blue-cell-viability-assay-monitoring-cell-viability.pdf?la=en

28. Maria Riedmeier. Bedeutung des humanen Gens icb-1 für die antiproliferative Wirkung von Antiöstrogenen in Mammakarzinomzellen [Dissertation]. Fakultät für Medizin: Universität Regensburg; 2020.
29. Satyaswaroop PG, Fleming H, Bressler RS, Gurpide E. Human endometrial cancer cell cultures for hormonal studies. Cancer Res. 1978;38(11 Pt 2):4367–75. PubMed PMID: 698977.
30. Shapiro SS, van der Schouw M, Hagerman DD. Failure of estrogen and progesterone to affect protein synthesis by an established endometrial cell line. Am J Obstet Gynecol. 1975;121(4):570–2. doi: 10.1016/0002-9378(75)90100-3. PubMed PMID: 1170755.
31. Pathmanathan N, Balleine RL. Ki67 and proliferation in breast cancer. J Clin Pathol. 2013;66(6):512–6. doi: 10.1136/jclinpath-2012-201085. PubMed PMID: 23436927.
32. Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson J-A. Estrogen receptor beta: An overview and update. Nucl Recept Signal. 2008;6:e003. doi: 10.1621/nrs.06003. PubMed PMID: 18301783.

Danksagung

Ich bedanke mich beim Lehrstuhlinhaber Herrn Prof. Dr. med. Olaf Ortmann für die Überlassung des interessanten Themas und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie der benötigten Materialien.

Zudem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. Oliver Treeck, der mich in der Planung und Durchführung der Experimente und später bei der Auswertung der Ergebnisse und schriftlichen Ausarbeitung der Dissertation stets unterstützt hat.

Außerdem gilt ebenfalls mein Dank Frau Bettina Federhofer, die mich sehr kompetent und professionell in die Arbeit im Labor eingeführt hat. Sie war stets eine große Unterstützung bei der experimentellen Arbeit und trug mit ihrer sympathischen und liebenswürdigen Persönlichkeit zu einer angenehmen Atmosphäre im Labor bei.

Schließlich gilt mein Dank meiner Familie & meinen Freunden, die mich stets emotional in der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt und ermutigt haben. Ich danke insbesondere Helmut & Gabi fürs Daumendrücken.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Luisa Derleth, die mich immer ermutigt und motiviert hat die Arbeit an der Dissertation weiterzuführen. Durch die gemeinsame Arbeit an der Dissertation ist eine Freundschaft entstanden, die ich sehr schätze.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- beziehungsweise Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 15.08.2021