

Aus dem Medizinischen Zentrum für
Hals-, Nasen und Ohrenheilkunde
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J. A. Werner
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg
GmbH, Standort Marburg

**Untersuchungen zur Bedeutung der Peptidyl-Prolyl-
Isomerase Pin1 bei der Pathogenese von Kopf-Hals-
Tumoren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Ariane Friederike Esther Rath

aus Trostberg bei Traunstein

Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 21.06.2012

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund
Referent: Prof. Dr. R. Mandic
1.Korreferent: Prof. Dr. J. Dahm-Daphi

Für meine Familie
in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kopf-Hals-Tumoren	1
1.2	Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen	3
1.3	Die Besonderheiten der PPIase Pin1	5
1.4	Prolin-gelenkte Phosphorylierung und anschließende Isomerisierung als wichtiger Signaltransduktionsmechanismus	6
1.5	Pin1 im Zellzyklus und in der Onkogenese.....	8
1.6	Zielsetzung	11
2	Material	12
2.1	Chemikalien.....	12
2.2	Zellkultur- und Bakterienkulturmedien.....	14
2.3	Puffer und Lösungen	14
2.4	Antikörper	19
2.5	Enzyme.....	19
2.6	Oligonukleotide und Plasmide	20
2.7	Längen- und Molekulargewichtsstandards.....	21
2.8	Zelllinien und Patientengewebe	22
2.8.1	Zelllinien	22
2.8.2	Patientengewebe.....	23
2.9	Komplette Anwendungssysteme („Kits“)	24
2.10	Geräte	25
3	Methoden.....	28
3.1	Zellbiologie	28
3.1.1	Zellkultur	28
3.1.1.1	Allgemeine Kulturbedingungen	28
3.1.1.2	Passagieren von Zellen.....	28
3.1.1.3	Auftauen von Zellen.....	28
3.1.1.4	Einfrieren von Zellen.....	29
3.1.2	Transfektionen und Assays	29
3.1.2.1	Transfektion mit Plasmiden.....	29
3.1.2.2	Transfektion mit siRNA	29

3.1.2.3	Behandlung von Zellkulturen mit Juglone	30
3.1.2.4	Zellzyklusanalyse	30
3.1.3	Proteinchemische Analysen	31
3.1.3.1	Herstellung von Zelllysaten.....	31
3.1.3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	31
3.1.3.3	Immunpräzipitation und Behandlung mit Alkalischer Phosphatase	32
3.1.3.4	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	33
3.1.3.5	Protein-Transfer.....	34
3.1.3.6	Protein-Detektion	35
3.1.3.7	„Stripping“ von Nitrozellulosemembranen	35
3.1.3.8	2D-Gelelektrophorese	36
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	38
3.2.1	Kultivierung und Transformation von Bakterien	38
3.2.2	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	39
3.2.3	Präparation von RNA aus Zelllinien und Geweben	39
3.2.4	cDNA-Synthese.....	39
3.2.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	39
3.2.6	Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	39
3.2.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	40
3.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten	40
3.2.9	DNA-Sequenzierung	40
3.2.10	Agarosegelelektrophorese	41
3.2.11	Gelextraktion von DNA-Fragmenten.....	41
3.2.12	Quantitative RT-PCR	42
3.3	Immunhistochemie	42
3.3.1	Fixieren und Einbettung in Paraffin	42
3.3.2	Immunhistochemische Färbung	43
4	Ergebnisse	45
4.1	Pin1-Proteinexpression in HNSCC-Zelllinien und -Geweben.....	45
4.1.1	Expressionsanalyse im Western Blot	45
4.1.2	Expressionsnachweis in der Immunhistochemie.....	46
4.1.3	Zytochemische Expressionsanalyse und subzelluläre Lokalisation	47
4.2	Pin1-Expression auf RNA-Ebene.....	48

4.3	Quantifizierung der Pin1-Western Blot-Signale und Korrelation mit klinischen Daten	49
4.4	Untersuchungen zum Phosphorylierungszustand von Pin1	51
4.4.1	Ergebnisse aus der 2D-Gelelektrophorese	51
4.4.2	Immunpräzipitation und Behandlung mit alkalischer Phosphatase	53
4.5	Mutationsanalyse.....	54
4.6	Ergebnisse der Pin1-Inhibitionsversuche	55
4.6.1	Pin1-Hemmung mit Juglone.....	55
4.6.2	Pin1-Hemmung mit siRNA	57
5	Diskussion.....	61
5.1	Überexpression von Pin1 in Tumoren.....	64
5.2	Aktivierungsgrad von Pin1 in Tumoren	68
5.3	Effekte der Pin1-Inhibition.....	69
5.4	Schlussfolgerung	71
6	Zusammenfassung	73
7	Summary	75
8	Literaturverzeichnis	77
9	Anhang	86
9.1	Humane Pin1-Nukleotidsequenz	86
9.2	Abkürzungsverzeichnis	87
9.3	Abbildungsverzeichnis	89
9.4	Tabellenverzeichnis.....	90
9.5	Publikationen.....	91
9.6	Danksagung	93

1 Einleitung

1.1 Kopf-Hals-Tumoren

Kopf-Hals-Karzinome sind eine heterogene Gruppe maligner Entartungen im Bereich der oberen Luft- und Speisewege. Bei über 90% der Fälle handelt es sich hierbei um Plattenepithelkarzinome (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC).

Schätzungsweise 650 000 neue HNSCC Fälle sind weltweit pro Jahr zu verzeichnen, wobei die Prävalenz sogar noch steigt (Parkin et al., 2005). Kopf-Hals-Karzinome haben in den USA die achthäufigste Inzidenz unter allen Tumorentitäten und machen einen Anteil von 3% aller Tumorneuerkrankungen aus (Jemal et al., 2010). Als ursächliche Risikofaktoren sind hierbei insbesondere Alkohol und Tabak zu nennen (Blot et al., 1988; Vineis et al., 2004). Seit neuerem ist auch das humane Papillomavirus, darunter vor allem die Serotypen 16 und 18, als Risikofaktor für die Entwicklung von HNSCC-Tumoren ins Interesse der Forschung gerückt (D'Souza et al., 2007).

Als kleiner Erfolg ist zu werten, dass zwischen 1990 und 2006 der Anteil an allen durch Krebs verursachten Todesfälle durch HNSCC um knapp 3% abgenommen hat (Jemal et al., 2010), was vermutlich sowohl auf Rückgang des Alkohol- und Tabakkonsums in der westlichen Welt (Curado and Hashibe, 2009) als auch auf verbesserte Behandlungsmethoden (effektivere Behandlung, weniger therapieinduzierte Nebenwirkungen) zurückzuführen ist. Allerdings blieben trotz jüngsten Fortschritten in Tumordiagnostik und -therapie die Überlebensraten für HNSCC-Patienten in den letzten 30 Jahren beinahe unverändert (Psyrrri and Fountzilias, 2006). Die Sterblichkeit bei HNSCC-Patienten steigt mit dem Fortschreiten (Stadium) der Erkrankung. Weltweit sterben jährlich ca. 350 000 Menschen an dieser Krankheit, wobei eine zunehmende Invasivität der Tumore bedingen kann, dass vitale Strukturen wie Luftwege und große Arterien im Kopf-Hals-Bereich verlegt werden, was zum Tod des Patienten führt.

Als zweithäufigste Todesursache ist die behandlungsassoziierte Toxizität zu nennen (Argiris et al., 2004). Auch ist die Anzahl von metachron auftretenden Zweitkarzinomen auf Grund der Risikofaktoren der Patienten erhöht (Lippman and Hong, 1989). Durch die Risikofaktoren, denen die HNSCC-Patienten ausgesetzt sind, wird die gesamte Schleimhaut der Luftwege durch die Einwirkung karzinogener Substanzen so

geschädigt, dass das Risiko für synchrone und metachrone Zweitkarzinome der Luftwege erhöht ist (Slaughter et al., 1953). Die Inzidenz für Zweitkarzinome beträgt ca. 3-5% / Jahr (Argiris et al., 2004). Dabei treten die häufigsten Zweitkarzinome in der Lunge auf, am zweithäufigsten sind HNSCC-Zweitkarzinome (Argiris et al., 2004). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass durch die Behandlung mit Chemotherapie und lokaler Bestrahlung zum Therapiezeitpunkt bisher okkulte lokale synchrone Zweittumoren oder Präkanzerosen beseitigt werden können, so dass Zweitkarzinome sich erst nach längerer Zeit im Kopf-Hals-Bereich entwickeln (Argiris et al., 2004). Die Therapie beinhaltet vor allem die chirurgische Entfernung der Tumore, deren Bestrahlung und den Einsatz der Chemotherapie (Argiris et al., 2004). Die drei Behandlungsmethoden werden bei lokal fortgeschrittener Erkrankung meist kombiniert (Furness et al., 2010). Dabei sind die Nebenwirkungen der Behandlung mitunter erheblich (Hanna et al., 2004a). Sowohl die funktionellen Beeinträchtigungen durch chirurgische Eingriffe, als auch durch die Nebenwirkungen der Radiochemotherapie wirken sich häufig negativ auf die Lebensqualität der Patienten aus (Hanna et al., 2004b).

Bisher stehen nur wenige Therapeutika aus dem Bereich der *targeted therapy* wie therapeutische Antikörper gegen Tumorzellepitope oder spezifische chemische Verbindungen, die als Tyrosinkinaseinhibitoren wirken, zur Verfügung und gezielt Tumorzellen angreifen oder in deren veränderte zelluläre Regulationssysteme hemmend eingreifen (Argiris and Karamouzis, 2010). Je spezifischer die Angriffspunkte bei der Tumorzelle sind, umso effektiver und ärmer an Nebenwirkungen ist die Behandlung für den Patienten. Um solche Angriffspunkte zu identifizieren, ist es essentiell, mehr über die Fehlregulationen des Zellwachstums in den unterschiedlichen Tumorzellen zu erfahren.

Auf der Suche nach den ursächlichen Störungen auf Zellzyklusebene und eventuellen therapeutischen Ansatzpunkten wurden bereits viele verschiedene in Frage kommende Kandidatengene bzw -proteine hinsichtlich ihres Einflusses bei der Entstehung von HNSCC-Tumoren untersucht. In dieser Arbeit soll das Protein Pin1 (Peptidylprolyl-cis/trans-isomerase-NIMA interacting 1) bezüglich jener Fragestellung näher untersucht werden. Da Pin1 an vielen Stellen im Zellzyklus eingreift und es in anderen Tumoren

bereits bei der Karzinogenese involviert zu sein scheint, ist es von großem Interesse, die Rolle von Pin1 bei HNSCC-Tumoren näher zu untersuchen.

1.2 Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen

Im Zellstoffwechsel funktionieren Signalübertragungen zumeist über Enzyme, die ihr Zielprotein in irgendeiner Weise modifizieren. Bei diesen posttranslationalen Modifikationen tritt die Veränderung am Substrat meist in Form von Lösung oder Anheftung kovalent gebundener chemischer Gruppen auf wie zum Beispiel die Phosphorylierung durch Kinasen, die Dephosphorylierung durch Phosphatasen, die Azetylierung durch Esterasen, oder auch Methylierungen oder Ubiquitinylierungen (Seet et al., 2006).

Diese Modifikationen schlagen sich immer in den biochemischen, immunologischen und/oder konformativen Eigenschaften des Proteins nieder. Aber auch durch nicht-kovalente Modifikation, wie z.B. durch direkten Umbau des Proteingerüsts können die Zielproteine in ihrer Konformation verändert und infolgedessen für nachfolgende Reaktionen aktiviert werden. Dazu gehört die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidbindungen. Eine Peptidbindung kann entweder in *cis*- oder *trans*-Position vorliegen. Die *trans*-Stellung ist energetisch günstiger und daher unter normalen Bedingungen die vorherrschende Position. Hiervon weichen allerdings Peptidbindungen ab, an denen Prolin beteiligt ist. Durch seine 5-Ring-Struktur wird die freie Energiedifferenz zwischen beiden konformellen Stellungen geringer (Lu et al., 2003). Die Peptidbindung kann in dem Fall zwischen beiden Stellungen wechseln, die beiden Konformationen stehen im Fließgleichgewicht. Allerdings geht die spontane Isomerisierung nur sehr langsam und selten vonstatten, nämlich im Bereich von Minuten. Enzyme, die sogenannten Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIasen), können diesen Isomerisierungsschritt katalysieren und damit um ein Vielfaches in den Bereich von Millisekunden hinein beschleunigen (Lang et al., 1987; Lu et al., 2007; Schmid, 2001).

Die Gruppe der Isomerasen lässt sich in 3 Untergruppen einteilen, die phylogenetisch konserviert sind: Zum einen die FK506-bindenden Proteine (FKBPs), die Cyclophiline und die Parvuline (Göthel and Marahiel, 1999; Hunter, 1998). Die Cyclophiline und die FK506-bindenden Proteine sind Angriffspunkte für die Immunsuppressiva Cyclosporin

und die Makrolidlactone FK506 bzw. Rapamycin. Ihre PPIase-Eigenschaft wird weder für ihre Funktion innerhalb des Immunsystems benötigt noch für Vorgänge des Zellzyklus (Schreiber, 1991). Sie sind vielmehr an Proteinfaltung und Assemblierungen beteiligt (Lu et al., 2007). Parvuline werden durch die eben genannten immunsuppressiven Substanzen nicht inhibiert, jedoch ist die PPIase-Aktivität einiger Parvuline durch 5-hydroxy-1,4-Naphthalenedion hemmbar (Hennig et al., 1998). Dabei handelt es sich um eine braun pigmentierte Substanz, die aus Rinde, Wurzeln, Blättern und Holz von Walnussbäumen (*Juglans nigra*) gewonnen werden kann und daher auch Juglone genannt wird (Hennig et al., 1998). Das Pin1-Protein gehört zwar zur Untergruppe der Parvuline, nimmt jedoch innerhalb dieser Gruppe eine Sonderstellung ein, da es über verschiedene einzigartige Eigenschaften verfügt, wie z.B. seine Substratspezifität oder seine Rolle im Zellzyklus.

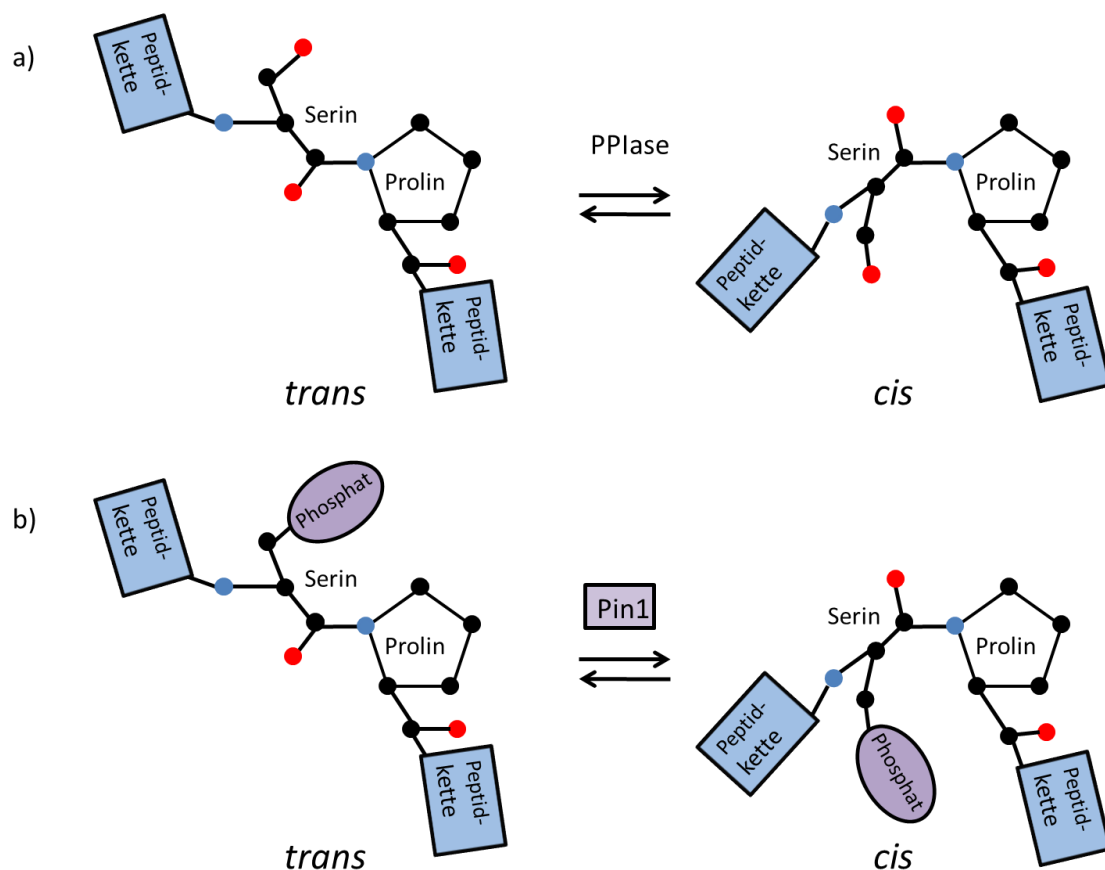


Abbildung 1. Cis/trans-Isomerisierung: a) PPIasen katalysieren die Isomerisierung von Zielproteinen zwischen dem *cis*- und *trans*-Isomer. Die Isomerisierung findet an der 5-Ring-Struktur des Prolins statt. b) Pin1 katalysiert die Isomerisierung ausschließlich, wenn dem Prolin ein phosphoryliertes Serin oder Threonin (hier in der Abbildung durch das Serin repräsentiert) vorausgeht (modifiziert nach Lu et al., 2002).

1.3 Die Besonderheiten der PPIase Pin1

Pin1 (*protein interacting with NIMA-1*) ist eine PPIase aus der Gruppe der Parvuline. Es weist ein Molekulargewicht von 18kDa auf und wurde auf der Suche nach mitoseregulierenden Proteinen als ein Interaktionspartner der NIMA-Kinase entdeckt. Die NIMA-Kinase (*never in mitosis A*) scheint während der Mitose in *Aspergillus nidulans* von großer Bedeutung zu sein, während der sie an mehreren Ser-/Thr-Resten phosphoryliert wird (Lu et al., 1996; Lu and Hunter, 1995). Dabei wurde herausgefunden, dass die Pin1-Überexpression in HeLa-Zellen zum Arrest der Zellen in der G2-Phase führte, während hingegen das Depletieren von Pin-1 vielmehr in einem Anhalten der Zellen in der Mitosephase mündete. Deswegen wurde Pin1 als ein negativer Regulator für den Eintritt in die Mitose und als positiver Regulator für das Durchlaufen der Mitose angesehen (Fujimori et al., 1999; Lu et al., 1996). Pin1 erschien als einzige PPIase unabdingbar für das Zellwachstum zu sein, was mit einer funktionierenden PPIase-Domäne verknüpft ist (Rahfeld et al., 1994; Rudd et al., 1995). Darüber hinaus führte eine Pin1-Hemmung durch Transfektion mit Antisense-Pin1 oder durch Hemmung mit dem natürlichen Pin1-Inhibitor Juglone zu einer vermehrten Apoptoserate (Rippmann et al., 2000). Obwohl Pin1 zur PPIasen-Subgruppe der Parvuline gehört, hebt es sich von den anderen PPIasen dieser Gruppe durch seine hohe Substratspezifität ab. Pin1 ist die bisher einzige bekannte PPIase, die spezifisch an das Dipeptid Phospho-Ser-(oder Thr)-Pro bindet und dort isomerisiert (Ranganathan et al., 1997; Yaffe et al., 1997).

Strukturell gesehen enthält Pin1 C-terminal eine PPIase-Domäne und N-terminal eine sogenannte WW-Domäne, die das Pin1-Protein zu seinem Substrat leitet. Diese enthält zwei hochkonservierte Tryptophanreste, die von 20 bis 22 Aminosäuren voneinander getrennt werden. Diese Tryptophanreste binden spezifisch an phosphorylierte Ser-/Thr-Pro-Sequenzen. Doch auch die PPIase-Domäne bindet durch zwei hochkonservierte Argininreste, welche sich in anderen PPIasen nicht finden, spezifisch an Phospho-Ser-/Thr-Pro-Sequenzen, so dass sowohl die WW- als auch die PPIase-Domäne die Substratspezifität vorgeben (Ranganathan et al., 1997; Yaffe et al., 1997; Zhou et al., 2000). Die PPIase-Domäne führt nach der Bindung an das Substrat die Isomerisierung der phosphorylierten Ser-/Thr-Pro-Sequenzen des Substrates durch mit unterschiedlichen Konsequenzen für die Funktion, das Bindungsverhalten und die Stabilität des jeweiligen Substrates. Pin1 wird seinerseits durch eine Phosphorylierung

am Ser16-Rest seiner WW-Domäne reguliert, so dass kein Substrat mehr gebunden werden kann (Lu et al., 2002b).



Abbildung 2. Domänenstruktur von Pin1: Pin1 ist zusammengesetzt aus einer N-terminalen WW-Domäne und einer C-terminalen PPIase-Domäne, die beide die Substratspezifität für pSer/Thr-Pro-Sequenzen vorgeben (modifiziert nach Lu et al., 2007).

1.4 Prolin-gelenkte Phosphorylierung und anschließende Isomerisierung als wichtiger Signaltransduktionsmechanismus

Die Wichtigkeit der posttranslationalen Modifikation für den Ablauf von Signalkaskaden als Informationsfluss auf Zellzyklusebene wurde im Abschnitt 1.2 kurz angerissen. Dabei ist die Phosphorylierung von Proteinen eine häufig vorkommende posttranslationale Modifikation, die durch das Zusammenspiel von Kinasen und Phosphatasen reguliert wird (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). Proteinkinasen hängen Phosphatgruppen an die Hydroxylreste der Aminosäuren Serin (Ser), Threonin (Thr) oder Tyrosin (Tyr) in der Peptidkette von Proteinen. Phosphatasen spalten solche Phosphatgruppen wieder ab. Phosphorylierung und Dephosphorylierung zählen zu den wichtigsten Signaltransduktionsmechanismen unter Proteinen zur Regulation des Zellstoffwechsels. Sie rufen zumeist eine Konformationsänderung des Phospho-Proteins hervor und ändern somit dessen Eigenschaften bezüglich z.B. des Bindungsverhaltens oder der katalytischen Aktivität, mit weitreichenden Konsequenzen für die Signaltransduktion stromabwärts der Kaskade (Pawson and Scott, 2005).

Die meisten Proteinkinasen weisen eine mehr oder minder ausgeprägte Sequenzspezifität auf, wobei in diesen Erkennungssequenzen bestimmte Schlüsselpositionen meist stark konserviert sind. So gibt es Kinasen, die die Ser/Thr-P Sequenz benötigen, binden und Ser oder Thr phosphorylieren. Sie phosphorylieren also spezifisch Serin- oder Threoninreste, denen in der Peptidkette ein Prolinrest folgt. Daher werden sie Prolin-gelenkte Kinasen (*pro-directed kinases*) genannt (Lu et al., 2002a). Der Mechanismus der Phosphorylierung von Ser/Thr-Pro-Sequenzen ist ein

Schlüsselmechanismus im Zellzyklus. Viele für den Zellzyklus wichtige Kinasen gehören zu jener Gruppe Prolin-gelenkter Kinasen, z.B. zyklinabhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDKs), *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs), *stress-activated protein kinases/c-Jun-N-terminal kinases* (SAPKs/JNKs) oder die *Glykogen Synthase Kinase 3* (GSK3). Die Substrate der Prolin-gelenkten Kinasen sind zumeist selbst Kinasen und phosphorylieren weitere Substrate und so fort. Durch ihre gemeinsame Spezialisierung auf Ser/Thr-Pro-Sequenzen arbeiten Prolin-gelenkte Kinasen sehr eng mit dem Pin1-Protein zusammen. Pin1 bindet exakt die gleiche Aminosäuresequenz und zwar nur, wenn sie am jeweiligen Ser- oder Thr-Rest durch die sogenannte „priming“-Kinase bereits phosphoryliert wurde (Yaffe et al., 1997). Die Prolin-gelenkte Phosphorylierung von Substraten und deren anschließende Isomerisierung durch Pin1 ist ein wichtiges Geschehen im Ablauf von Signaltransduktionskaskaden in der Regulation zahlreicher Ereignisse des Zellzyklus (Lu et al., 2007).

Die besondere Rolle von Pin1 wird dadurch ersichtlich, dass z.B. durch Prolin-gelenkte Phosphorylierung die spontane *cis/trans*-Isomerisierungsrate stark abnimmt und die Bindung anderer PPIasen unmöglich macht. Einzig Pin1 kann dann noch binden und isomerisieren (Uchida et al., 1999). Auch können die von Pin1 isomerisierten Substrate beispielsweise vor Dephosphorylierung geschützt werden, da viele Phosphatasen nur an *trans*-Isomeren angreifen können. Ohne die katalytische Aktivität von Pin1 würde die Wiederherstellung des Gleichgewichtes zwischen *cis*- und *trans*-konfigurierten Proteinen mehrere Minuten benötigen. Pin1 kann dies in einem Zeitrahmen von Millisekunden bewirken. Dies macht Pin1 höchst relevant für die Regulation dynamischer Prozesse innerhalb des Zellstoffwechsels (Pastorino et al., 2006). Die Interaktionspartner von Pin1 sind dabei zahlreich und an vielen Stellen des Zellzyklus involviert (siehe Tabelle 1).

Pin1 nimmt vielfältige Funktionen in der Zelle ein. Es ist in die Onkogenese auf verschiedenste Weise involviert (Lu and Zhou, 2007). Aber auch in der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, wie insbesondere die Alzheimersche Krankheit (Liou et al., 2003), in der Immunantwort und bei Autoimmunerkrankungen spielt Pin1 eine Rolle (Lee et al., 2011). Im Folgenden beschränkt sich die vorliegende Arbeit auf die Rolle der PPIase Pin1 bei der Onkogenese.

Tabelle 1. Beispiele für Interaktionspartner des Pin1-Proteins.

Pin1 Substrat	Substratfunktion
Cdc25 (<i>Cell division cycle protein 25</i>)	Mitotische Phosphatase
NIMA (<i>never in mitosis A</i>)	Mitotische Kinase
Plk 1 (<i>polo-like kinase 1</i>)	Mitotische Kinase
Cdc27 (<i>Cell division cycle protein 27</i>)	Anaphase promoting complex
Bcl-2 (<i>B-cell lymphoma 2</i>)	Antiapoptotisches Protein
TopII α	Topoisomerase II α
Tau	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
Pol II	RNA-Polymerase II
c-Jun	Transkriptionsfaktor
β -catenin	Transkriptionsfaktor
p53	Transkriptionsfaktor
NF- κ B (<i>nuclear factor kappa B</i>)	Transkriptionsfaktor
Cyclin D1	G1/S-Zyklus
Ki-67	Proliferationsmarker
NFAT (<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>)	Transkriptionsfaktor

Dargestellt sind die wichtigsten Interaktionspartner des Pin1-Proteins und ihre Funktion im Zellzyklus (Modifiziert nach Lu et al. 2004; (für Referenzen des Substratnachweises: siehe dort)).

1.5 Pin1 im Zellzyklus und in der Onkogenese

Prolin-gelenkte Phosphorylierung von Proteinen an bestimmten Ser- /Thr-Resten ist ein essentieller Signaltransduktionsmechanismus bei Prozessen der Zellproliferation und Zelltransformation im Rahmen der Zellantwort auf externe wachstumsfördernde Reize. Pin1 bindet und isomerisiert zahlreiche Proteine, die in der Tumorgenese häufig vertreten sind (Lu and Zhou, 2007). Darunter sind unter anderem β -Catenin, NF- κ B, Cyclin D1 and p53 zu nennen. Pin1 reguliert die Dauer und die Qualität der Signaltransduktion, die der Phosphorylierung jener Proteine folgt. Im Folgenden wird beispielhaft die Rolle des Pin1-Proteins in den wichtigsten onkogenen Signaltransduktionskaskaden (Wnt/ β -catenin-, Cytokin/NF- κ B- und Neu-Ras-Raf-MAP-Kinase-Kaskade) beschrieben.

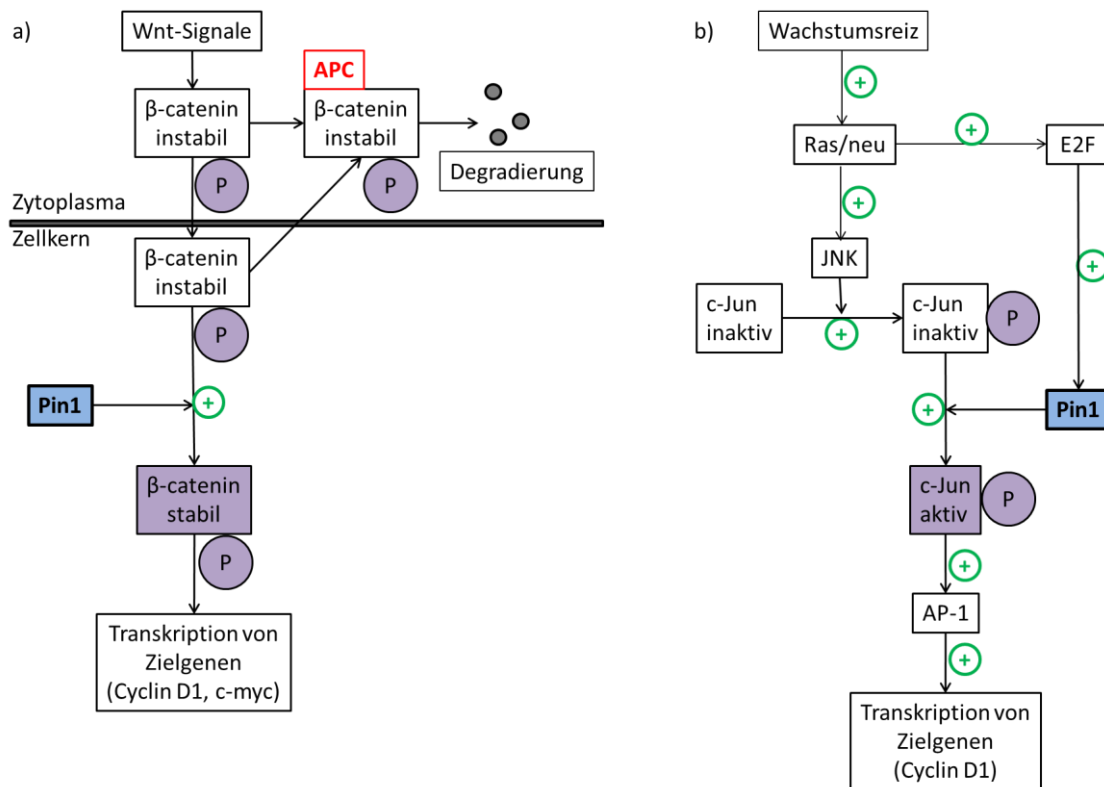


Abbildung 3. Rolle von Pin1 im Ras- und im Wnt-Signalweg (nach Lu et al., 2004). a) Im Wnt-Signalweg b) Rezeptortyrosinkinase/Ras-Signalweg. Zur Erläuterung: siehe Text.

Als wichtigster Transkriptionsaktivator im Wnt-Pathway wird β -Catenin durch den APC-Komplex (*adenomatous polyposis coli*) reguliert. APC integriert β -Catenin in einen größeren Proteinkomplex, in dem sich unter anderem auch die Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) befindet. Bei ausbleibendem Signal durch Wnt-Faktoren wird β -Catenin von GSK-3 β phosphoryliert und damit zur Degradierung im Proteasom markiert (Polakis, 2000). Pin1 stabilisiert β -Catenin, indem es spezifisch an die pSer 246-Pro-Sequenz des β -Catenin bindet und somit verhindert, dass APC an β -Catenin bindet. Außerdem fördert Pin1 die Translokation von β -Catenin in den Zellkern (Ryo et al., 2001). Im Zellkern agiert β -Catenin dann als Transkriptionsaktivator verschiedener proliferationsfördernder Gene wie z.B. *myc* oder *Cyclin D1*, ebenfalls Proteine, die in der Onkogenese häufig Störungen unterliegen. Pin1 ist damit ein wichtiger Regulator von β -Catenin.

Im Zytokin-NF- κ B-Signalweg bindet und isomerisiert Pin1 am pThr254-Pro der NF- κ B-Untereinheit p65 und verhindert so, dass der endogene Inhibitor I κ B α von NF- κ B die p65-Untereinheit hemmt. So wird NF- κ B stabilisiert und kann in den Zellkern

übertreten und dort als Transkriptionsfaktor agieren (Ryo et al., 2003b). Eines der vielen von NF- κ B gesteuerten und hochregulierten Gene ist Cyclin D1. Auch hier entfaltet Pin1 eine direkte Wirkung auf das Proliferationsverhalten von Zellen.

Als weiteres Beispiel kann der HER2/Neu-Raf-Ras-MAP-Kinase-Pathway genannt werden. Der Wachstumsfaktorrezeptor Neu aktiviert zunächst Ras und Raf als Folge eines Wachstumsreizes. Dadurch kommt die MAP-Kinase-Kaskade in Gang. Die MAPKs, z.B. ERK, phosphorylieren c-Jun und c-Fos, die dafür sorgen, dass AP-1 vermehrt die Transkription verschiedener Gene veranlasst, wie beispielsweise wiederum Cyclin D1, welches den Zellzyklus antreibt. Pin1 isomerisiert sowohl c-Jun als auch c-Fos, nachdem beide nach Wachstumsreizen von MAPKs an Ser/Thr-Pro-Sequenzen phosphoryliert wurden und stabilisiert sie (Monje et al., 2005). Zusätzlich interagiert Pin1 auch direkt mit Cyclin D1, stabilisiert es und fördert seine Ansammlung im Zellkern (Monje et al., 2005; Wulf et al., 2001).

Die Transkription von Pin1 selbst wird wiederum durch den Transkriptionsfaktor E2F initiiert, welcher stromabwärts des Neu-Raf-Ras-Signalweges steht (Ryo et al., 2002). Somit ergibt sich zusätzlich ein positiver Rückkopplungsmechanismus für wachstumsfördernde Reize, da Pin1 seinerseits die Transkription von Cyclin D1 und E2F über die Isomerisierung und somit Stabilisierung von Phospho-c-Jun und Phospho-c-Fos antreibt. Außerdem wird mittels der Isomerisierung von Phospho Ser/Pro-Stellen der Raf-Kinase durch Pin1 die Dephosphorylierung der Raf-Kinase durch die Protein-Phosphatase 2a (PP2a) forciert und so deren konsekutive Stabilisierung nach Mitogenstimulus gesichert (Dougherty et al., 2005). Hierdurch wird eine negative Rückkopplung verhindert und die Dauer des Ras-Raf-Signals verlängert.

Im Bezug auf p53 nimmt Pin1 eine widersprüchliche Funktion wahr. Entgegen den sonst beobachteten pro-onkogenetischen Effekten von Pin1, scheint die PPIase hier das Tumorsuppressorprotein p53 in seiner Funktion zu unterstützen. Zum einen fördert Pin1 die Aktivität von phosphoryliertem p53 nach DNA-Schädigung (Zacchi et al., 2002; Zheng et al., 2002). Zum anderen sorgt einer Pin1-Inhibition dafür, dass sich der Ubiquitinylierungszustand von p53 von einer Oligo- zu einer Polyubiquitinylierung und somit zu einer vermehrten Degradation im Proteasom ändert (Siepe and Jentsch, 2009). Weiterhin fördert Pin1 die Azetylierung von p53 durch die p300 Azetyltransferase und

seiner Dissoziation vom Apoptoseinhibitor iASPP (Mantovani et al., 2007). Dieser Vorgang ist für die Tumorsuppressorfunktion von p53 notwendig. Das p53-Homolog p73 wird ebenfalls von Pin1 aktiviert und kann so seine pro-apoptotische Funktion entfalten (Mantovani et al., 2004). Allerdings ist p53 in vielen Tumoren mutiert und verfügt in seiner mutierten Form über pro-onkogenetische Eigenschaften (Oren and Rotter, 2010; Soussi and Wiman, 2007). Auch diese pro-onkogenetischen Eigenschaften von mutiertem p53 bedürfen der Interaktion von Pin1. So kann Pin1 in Tumoren mit einer Mutation im TP53-Gen dessen proliferations- und invasionssteigernde Eigenschaften fördern (Girardini et al., 2011).

1.6 Zielsetzung

Die zuvor genannten Signalwege, in denen Pin1 stark involviert ist, spielen ebenfalls eine große Rolle in der Onkogenese. Angesichts dessen und der Tatsache, dass Pin1 in vielen Tumoren überexprimiert wird, stellt sich die Frage, ob Pin1 auch in HNSCC relevant für die Entartung der Zellen ist. In dieser Arbeit soll untersucht werden, wie sich die Expression von Pin1 in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen verglichen mit normalem Gewebe verhält. Ferner soll der Phosphorylierungszustand von Pin1 in HNSCC-Geweben und somit sein Aktivitätsgrad mit normalen Geweben verglichen werden. Schließlich soll untersucht werden, welche Konsequenzen sich aus einer Hemmung des Pin1-Proteins für den HNSCC-Zellstoffwechsel ergeben.

2 Material

Die wichtigsten Chemikalien und sonstige Verbrauchsmaterialien sind in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt. Gesonderte Auflistungen der eingesetzten Medien, Puffer und Lösungen, Zelllinien und Gewebe finden sich in den nachfolgenden Unterkapiteln.

2.1 Chemikalien

Die in Tabelle 2 abgebildeten Chemikalien wurden verwendet.

Tabelle 2. Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Produkt*)	Hersteller
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid 30% Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose	Gibco, Karlsruhe
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Amphotericin B	Bristol-Myers Squibb, München
Annexin V	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Bio-Rad Protein Dye	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
bis(2-hydroxyethyl)-Disulfid (HED)	Sigma Aldrich, Steinheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Bromophenol Blau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylamino]-	Sigma Aldrich, Steinheim
Coomassie Blue R-250	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO)	Merck, Darmstadt
1,4-dithio-D-threitol (DTT)	Amersham Bioscience, Sunnyvale, CA, USA
Dulbecco's Minimal Essential Medium	Bio Whittaker, Verviers, Belgium
ECL (Enhanced Chemiluminescence)	Amersham Bioscience, Sunnyvale, CA, USA
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Schmidt Chemikalien, Dillenburg
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fluorescent Mounting Medium	Dakocytomation, Carpinteria, CA, USA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Sigma, Seelze
HCl	Merck, Darmstadt

Hämatoxylin Lösung	Fluka, Steinheim
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HiperFect [®]	Qiagen, Hilden
Iodoacetamid	Sigma, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Juglone (5-hydroxy-1,4-Naphthalenedion)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Schmidt Chemikalien, Dillenburg
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nonidet P-40 (NP40)	Fluka, Steinheim
Penicillin / Streptomycin-Gemisch	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma, Saint Louis, MO, USA
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom KG, Berlin
Polyacrylamid	Serva, Heidelberg
Ponceau S	Sigma Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma, St. Louis, MO, USA
Protein A/G PLUS-Agarose	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Puffer Lösung (pH 4,00)	Merck, Darmstadt
Puffer Lösung (pH 7,00)	Merck, Darmstadt
Rabbit serum (normal)	Dako, Glostrup, Denmark
Roti [®] -Histol	Roth, Karlsruhe
Sodium-dodecyl-sulphate (SDS)	Serva, Heidelberg
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Sigma, München
Thioharnstoff	Sigma, München
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Sigma, Steinheim
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, München
Trypan-Blau	Sigma, St. Louis, MO, USA
Trypsin	BioChrom, Berlin
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

*Dargestellt sind alle in der Arbeit verwendeten Chemikalien und die Firma, von der sie bezogen wurden. *) Alle genannten Produkte entsprechen pro Analyti Qualität.*

2.2 Zellkultur- und Bakterienkulturmedien

Im Folgenden wird die Zusammensetzung der verwendeten Zellkultur- und Bakterienkulturmedien angegeben.

DMEM Vollmedium

Dulbecco's modified Eagle medium (4,5g/l Glukose) (Cambex Bio Science, Belgien)

1% L-Glutamin, 200mM (PAA Laboratories)

10% FCS (Fetales Kälberserum) (Gibco, Karlsruhe)

1% Penicillin/Streptomycin (10 000 U/l Penicillin G, 10 mg/ml Streptomycin)

0,1% Gentamicin (50 mg/ml)

0,1% Amphotericin B (250 µg/ml) (PAA Laboratories)

Einfriermedium

Dulbecco's modified Eagle medium (4,5g/l Glukose)

10% DMSO (Dimethylsulfoxid) (Merck, Darmstadt)

LB-Agar

Luria Bertani Agar (Roth, Karlsruhe)

40g Pulver auf 1l H₂O, Autoklavieren

Selektionszusatz: 50µg/ml Ampicillin

LB-Medium

Luria Bertani Medium (Roth, Karlsruhe)

25g Pulver auf 1l H₂O, Autoklavieren

Selektionszusatz 50µg/ml Ampicillin

2.3 Puffer und Lösungen

Die hier in alphabetischer Reihenfolge aufgeführten Lösungen und Puffer wurden für diese Arbeit verwendet. Soweit nicht anders erwähnt, wurden sämtliche Puffer und Lösungen in aqua bidest hergestellt.

2D-Probenpuffer

8M Harnstoff

2M Thioharnstoff

4% CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylamino]-Propansulfat)

0,1 M HED (bis(2-hydroxyethyl)Disulfid Proteinase-Inhibitor (100µl/ml Probenpuffer)

Phosphatase-Inhibitor (50µl/ml Probenpuffer)

Agarose-Versiegelungslösung für Immobiline[®]-pH-Gradientenstreifen

25 mM Tris-Base

192 mM Glycine

0,1% SDS

0,5% Agarose

0,002% Bromphenolblau

Auf 100 ml a.d.

Acrylamid-Stammlösung

Rotiphorese-Gel 30 (Roth, Karlsruhe)

Ampicillin

0,1g/ml in a.d.

Steril filtrieren, aliquotieren, -20° C

Blocklösung (Western Blot)

1 x TBS

5% Magermilchpulver (Merck)

0,1% Tween[®]20 (Calbiochem-Novabiochem)

Bradford- Reagenz

20% Bio-Rad Protein Assay (Biorad, München) in a.d.

Blotpuffer

0,2 M Glycin (Roth, Karlsruhe)

25 mM Tris-Base (Acros Organics)

20% Methanol (Sigma-Aldrich)

DAPI - Arbeitslösung

DAPI (2',6-Diamidin-2'-phenolindol-dihydrochlorid) (Roche)

a.d. bis zu einer Endkonzentration von 1mg/ml lösen

aliquotieren, Lagerung bei -20 °C

Ethidiumbromid

1%ige Lösung (Roth, Karlsruhe)

Formalinlösung

4% Formalin in a.d.

IPG-Puffer

IPG-Puffer (immobilized pH gradient buffer), pH 3-11 (GE Healthcare, München)

6x Ladepuffer für Nukleinsäuren

0,25% Bromphenolblau

0,25% Xylencyanol

30% Glycerol in H₂O

Auf 25 ml, aliquotieren, Lagerung bei -20 °C.

Lipofectamine[®] 2000

1 mg/ml (Invitrogen, Karlsruhe), Lagerung bei 4°C

Natriumcitrat-Dihydratpuffer (Immunhistochemie)

10mM tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Roth, Karlsruhe), pH 6

NP40 - Lysispuffer

137mM NaCl

1% NP40

20mM Tris/Hcl pH 7,5

2mM EDTA

10% Glycerol

Proteinase-Inhibitor (100µl/ml NP40-Stock)

Phosphatase-Inhibitor (50µl/ml NP40-Stock)

PBS (Westernblot und Zellkultur)

2,7 mM KCl

1,5 mM KH₂PO₄

140,0 mM NaCl

8,1 mM Na₂HPO

pH 7,4

für Zellkultur autoklavieren, Lagerung bei 4°C

PBS (Immunhistochemie)

0,15 x PBS, pH 7,4

Ponceau-Lösung

Ponceau S solution

(0,1 % Ponceau S in 5% Essigsäure)

Pufferlösung für Immuncytochemie

1 M PBS

3% BSA

0,3% NP40

Rehydratisierungslösung für Immobiline[®]-pH-Gradientenstreifen

7 M Harnstoff

2 M Thioharnstoff

2% CHAPS

2% IPG-Puffer

0,002% Bromphenolblau

auf 25 ml a.d.

7 mg DTT/2,5 ml Rehydratisierungslösung unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen

SDS-Äquilibriumspuffer

6 M Harnstoff

75 mM Tris-HCl, pH 8,8

29,3% Glycerol

2% SDS

0,002% Bromphenolblau

auf 200 ml a.d.

10x SDS-Laufpuffer

0,25 M Tris, pH 8,3

604 g Tris-Base

376 g Glycin

20 g SDS, auf 2 l a.d.

SDS Sample Buffer Laemmli (2x)(Sigma-Aldrich)

aliquotieren und aufbewahren bei -20°C

5x TAE-Puffer

0,2 M Tris-Base

5,7% Essigsäure (100%)

1 mM EDTA

10x TBS

0,2 M Tris-HCl

1,37 M NaCl, pH 7,6

TBS/T 0,1

1x TBS

0,1% Tween 20

Primary antibody solution, (Verdünnungslösung für Primärantikörper bei Westernblots)

10x TBS

5 % BSA (Bovine Serum Albumin, pH 7,0)

0,1 % Tween 20

2.4 Antikörper

Folgende Antikörper wurden in dieser Arbeit als Primärantikörper verwendet.

Tabelle 3. Verwendete Primärantikörper.

Antikörper	Herkunft
β-Actin, clone AC-74	Sigma Aldrich, Steinheim
Bax (B-9), monoclonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Bcl _{xL} (H-5), monoclonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Caspase 3 (H-277), polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Cyclin D1, clone DCS-6	Sigma Aldrich, Steinheim
MAP-Kinase, activated (diphosphorylated ERK-1&2), clone MAPK-YT	Sigma Aldrich, Steinheim
MAP-Kinase 1/2 (Erk 1/2), polyclonal	Upstate (Millipore), Billerica, MA, USA
p21 ^{WAF/Cip1} (C-19), polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
p53, clone BP53-12	Sigma Aldrich, Steinheim
PARP [Poly(ADP-ribose) polymerase], clone 703-6	BD Biosciences, Heidelberg
Pin1 (PC270), polyclonal	Calbiochem, Darmstadt

Dargestellt sind in alphanumerischer Reihenfolge die in der Arbeit verwendeten Antikörper und der Hersteller, von dem sie bezogen wurden.

Folgende Sekundärantikörper kamen zum Einsatz: Anti-Maus (HRP gekoppelt oder biotinyliert) und Anti-Kaninchen (HRP-gekoppelt, Texas Red (TR)- gekoppelt oder biotinyliert). Die Sekundärantikörper wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA), der Firma Sigma-Aldrich Inc. (Saint Louis, MO, USA) oder von der Firma Dako (Hamburg) bezogen.

2.5 Enzyme

Alle Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt) bezogen, außer der RNase A, die von der Firma Sigma (Taufkirchen) stammte. Für die Experimente mit Restriktionsenzymen wurden die vom Hersteller jeweils mitgelieferten Reaktionspuffer verwendet. Für die Alkalische Phosphatase wurde der mitgelieferte Puffer benutzt.

Tabelle 4. Verwendete Enzyme.

Name	Funktion
Bgl I	Restriktionsenzym
Hind III	Restriktionsenzym
EcoRI	Restriktionsenzym
T4-DNA-Ligase	Enzym zum Ligieren von DNA-Fragmenten
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase	Alkalische Phosphatase zur Dephosphorylierung von Serin-, Threonin oder Tyrosinresten
RNase A	Vorbehandlung der Zellen für Durchflusszytometrie

Dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und ihre Funktion.

2.6 Oligonukleotide und Plasmide

Alle eingesetzten Primer (Oligonukleotide) wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Darunter waren auch die unspezifischen oligo-dT-Primer, die als Startermoleküle bei der cDNA-Synthese eingesetzt wurden.

Tabelle 5. Verwendete Primer.

Primer für die Sequenzanalyse und die Klonierungsarbeiten		
Bezeichnung	Gen	Sequenz (5' – 3' - Orientierung)
5' – Primer	Pin1	TCGAAGCTTGCCTGCGGCAGGAGGGAAG
3' – Primer	Pin1	TCGGAATTCCCAGGCCTGGGCTCCCCACCC
Oligonukleotide für Expressionsanalyse mit quantitativer PCR		
Bezeichnung	Gen	Sequenz (5' – 3' - Orientierung)
5' – Primer	Pin1	ATCACCCGGACCAAGGAG
3' – Primer	Pin1	CTGTGAGGCCAGAGACTCAA
5' – Primer	Aktin	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC
3' – Primer	Aktin	CAATAGTGATGACCTGGCCGT

Dargestellt sind die verwendeten Primer mit ihrer Sequenz und ihrem Zielgen.

In der Tabelle 6 sind die für die Inhibitionsversuche verwendeten siRNAs gegen das Zielgen Pin1 (GenBank-Nummer NM_006221) aufgeführt. Die komplette Sequenz der humanen mRNA von Pin1 befindet sich im Anhang der Arbeit.

Tabelle 6. Verwendete siRNAs.

	Bezeichnung	Hersteller	Sequenz (5'-3')
Pin1-spezifische siRNA I	SI02662128: Hs_PIN1_5 HP Validated	Qiagen, Hilden	GACCGCCAGAUUCUCCCUU AA
Pin1-spezifische siRNA II	sc-36230	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	Heterogenes Gemisch aus drei siRNAs: GUCAGAUGCAGAAGCCAUU, CCGAAUUGUUUCUAGUUAG, UCCUCUGUUCAGUCGCAA
Kontroll-siRNA I	AllStars Neg. Control siRNA (1027281)	Qiagen, Hilden	Proprietäre nonsense-Sequenz, (vom Hersteller nicht offengelegt)
Kontroll-siRNA II	sc-37007	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	Proprietäre nonsense-Sequenz, (vom Hersteller nicht offengelegt)

Dargestellt sind die verwendeten siRNAs mit ihrer Sequenz, ihrer Herstellerbezeichnung, der jeweiligen Kontroll-RNA (scrambled RNA) und der Bezugsquelle.

Das Konjugat siRNAFITC (sc-36869) der Firma Santa Cruz Biotechnology als methodische Kontrolle mitgeführt.

Für Klonierungsarbeiten wurde das Plasmid pEGFP-C1 der Firma Bioscience Clontech (Palo Alto, CA, USA) verwendet.

2.7 Längen- und Molekulargewichtsstandards

Die in dieser Arbeit verwendeten Längen- und Molekulargewichtsstandards sind in der Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7. Längen- und Molekulargewichtsstandards.

Name	Verwendung	Firma
Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range	Protein-Massenstandard für SDS-PAGE-Gelelektrophorese	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
#161-0373	Protein-Massenstandard für die 2D-Gelelektrophorese	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
#161-0320	Protein-Massenstandard für die 2D-Gelelektrophorese	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Lambda Hind	DNA-Massenstandard für Agarosegele	New England Biolabs,

III Digest		Frankfurt am Main
ΦX174 Hae III Digest	DNA-Massenstandard für Agarosegele	New England Biolabs, Frankfurt am Main

Dargestellt sind alle in dieser Arbeit verwendeten Längen- und Molekulargewichtsstandards mit ihrem Herstellernamen und der Bezugsquelle.

2.8 Zelllinien und Patientengewebe

2.8.1 Zelllinien

Die UM-SCC und die UT-SCC Zelllinien wurden freundlicherweise von Dr. Thomas E. Carey (University of Michigan, MI, USA) und Dr. Reidar Grénman (University of Turku, Finnland) zur Verfügung gestellt (Lansford et al., 1999). Die UMB-SCC Zelllinien stammen aus dem Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohren-Heilkunde der Philipps-Universität Marburg (Mandic et al., 2004). Die verwendeten HNSCC-Zelllinien sind in Tabelle 8 mit den jeweiligen Angaben zum Primärtumor und den Patientendaten dargestellt.

Tabelle 8. Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Primarius	Ort der Entnahme	TNM	Grading	Alter (a)	Geschlecht
UM-SCC-1	Mundboden	PT	T2N0M0	G2	73	M
UM-SCC-3	Nase	LK	T1N0M0	G2-G1	73	W
UM-SCC-4	Tonsille	PT	T3N2M0	G3	47	W
UM-SCC-9	Zunge	PT	T2N0M0	G2-G1	71	W
UM-SCC-11B	Larynx	PT	T2N2M0	U	65	M
UM-SCC-14A	Mundboden	PT	T1N0M0	G2-G3	58	W
UM-SCC-22B	Hypopharynx	LK	T2N1M0	G2	58	W
UM-SCC-27	Zunge	LK	T1N0M0	U	62	M
UMB-SCC-745	Oropharynx	PT	T4N2M0	G2	48	M
UMB-SCC-864	Zunge	PT	T2N2M0	G2	59	M
UMB-SCC-969	Tonsille	PT	T4N2M1	G2	67	M
UT-SCC-12A	Nasenhaut	PT	T2N0M0	G1	81	W
UT-SCC-12A	Nasenhaut	LK	T2N0M0	G1	81	W
UT-SCC-16A	Zunge	PT	T3N0M0	G3	77	W
UT-SCC-16B	Zunge	LK	T3N0M0	G3	77	W
UT-SCC-24A	Zunge	PT	T2N0M0	G2	41	M

UT-SCC-26A	Hypopharynx	LK	T1N2M0	G2	60	M
------------	-------------	----	--------	----	----	---

PT = Primärtumor; LK = Lymphknoten; TNM: T = Primärtumor, N = Lymphknotenmetastase, M = Fernmetastase; G = Differenzierungsgrad; U=Unbekannt; M = männlich; W = weiblich

2.8.2 Patientengewebe

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit mit Patientengewebe lag ein positives Ethikkommissionsvotum vor. Der Studientitel des Ethikantrags lautet: „Zell- und Molekularbiologische Untersuchungen von Geweben, Biomolekülen und Kandidatengenomen bei Erkrankungen des Kopf- Halsbereiches“(149/07). Die Gewebe wurden nach Einwilligung der Patienten im Rahmen von planmäßig durchgeführten Operationen entnommen. Es handelt sich um Gewebeproben von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals Bereiches. Die Gewebe wurden zufällig ausgewählt. Genauere Informationen bezüglich der Lokalisation des Primärtumors, des TNM-Stadiums, des Differenzierungsgrades und des Alters und Geschlechts der Patienten ergeben sich aus Tabelle 9. Das Material wurde nach Erhalt aus dem OP-Saal umgehend bei -80°C eingefroren. Für die immunhistochemischen Experimente wurden Gewebeproben in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Tabelle 9: Verwendete Patientengewebe

Gewebe	Entnahmestelle	TNM	Grading	Alter (Jahre)	Geschlecht
1164	Larynx	T4N2M0	G2	75	M
1179	Larynx	T3N1M0	G2	44	M
1194	Larynx	T3N2M1	Unbekannt	81	M
1202	Larynx	T3N1M0	G2	67	M
1208	Larynx	T4N0M0	G2	57	M
1224	Oropharynx	Unbekannt	G3	57	M
1228	Hypopharynx	T1N0M0	G2	63	M
1229	Hypopharynx	T2N2M0	Unbekannt	53	W
1237	Larynx	T2N1M0	G3	52	M
1248	Larynx	T4N2M0	G2	75	M
1261	Hypopharynx	T2N1M0	G3	71	W
1263	Oropharynx	T4N2M0	G2	76	M
1266	Oropharynx	T3N2M0	Unbekannt	52	M
1267	Oropharynx	T4N2M0	G2	68	W

1303	Oropharynx	T2N2M0	G2	53	W
1347	Larynx	T3N3M1	G2	68	W
1364	Larynx	T3N1M0	G2	41	M
1372	Oropharynx	T4N2Mx	G2	52	M
1379	Hypopharynx	T2N0M0	G2	65	M
1389	Hypopharynx	T4N2M0	G2	52	M
1397	Hypopharynx	T4N3M0	G3	44	W
1409	Hypopharynx	T2N2M0	G2	55	M
1414	Larynx	T2N2M0	G2	67	W
1416	Hypopharynx	TxN0M0	Unbekannt	53	M
1427	Larynx	T3N1M1	Unbekannt	57	M
1433	Hypopharynx	T2N2M0	G3	67	M
1480	Hypopharynx	T2N2Mx	Unbekannt	48	M

TNM: T = Primärtumor, N = Lymphknotenmetastase, M = Fernmetastase; G = Differenzierungsgrad; M = männlich; W = weiblich

Sowohl bei den Western Blot Analysen als auch bei der quantitativen PCR wurde jeweils normale Rachenschleimhaut von Patienten, die mit einer Uvulovelopalatopharyngoplastik (UVPP = Zäpfchenverkleinerung und Gaumensegelstraffung) als Therapie eines obstruktiven Schlafapnoesyndroms behandelt wurden, als Negativkontrolle herangezogen.

2.9 Komplette Anwendungssysteme („Kits“)

Die in dieser Arbeit verwendeten Anwendungssysteme sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10. Verwendete Komplettsysteme

KIT	Verwendung	Hersteller
QIAprep Spin Midiprep Kit	Aufreinigung von Plasmiden aus Bakterien	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit (250)	Aufreinigung von DNA aus Agarosegel	Qiagen, Hilden
Rneasy Mini Kit (250)	Extraktion von RNA aus Zellen oder Geweben	Qiagen, Hilden
REDTaq [®] Ready Mix (tm) PCR reaction Mix	PCR	Sigma Aldrich, Steinheim
Transskriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Reverse Transkription von RNA zur Synthese von	Roche, Mannheim

	cDNA	
ECL Detection Kit	Visualisierung von Banden auf Western Blot Membranen	Thermo Scientific, Bonn
StreptABCComplex/HRP	Immunhistochemie	Dako, Glostrup, Denmark
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System	Immunhistochemie	Dako, Glostrup, Denmark
TACS [®] -AnnexinV-System	Durchflusszytometrie	Trevigen, Gaithersburg, MD, USA

Dargestellt sind alle in dieser Arbeit verwendeten KIT's mit ihrer Herstellerbezeichnung.

2.10 Geräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Verwendete Geräte und Utensilien.

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	Autoclavispa	Fedegari, München
Aqua dest. Automat	Membrapure	Astacus, Liederbach
Bakterieninkubator	C24 Incubator shaker	New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA
Blotkammer	Mini Protean [®] 3cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
CO ₂ -Inkubator	Function line	Haereus, Hanau
Deckgläschen	24 x 40 mm	Menzel, Braunschweig
Durchflusszytometer	BD FACSCalibur Flow Cytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Einfrierröhrchen	2 ml	Nunc, Langenselbold
Eppendorf-Reaktionsgefäße	1 ml 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Entwicklungsmaschine	Optimax [®] Typ TR	Protec, Oberstenfeld
Absorptiometer	BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Plastikröhrchen	15 ml 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Film	Curix HT1.000G PLUS	AGFA, Bonn
Filmentwickler	Citroline 2000	Adefo-Chemie, Dietzenbach
Fixierer	Adefofix	Adefo-Chemie, Dietzenbach
Geldetektorkammer	Gel Doc 2000	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Gelelektrophorese-	Für Western Blots:	Bio-Rad Laboratories,

Apparatur	Für Agarose-Gele: Biomax MP1015	Hercules, CA, USA Kodak, Stuttgart
Hamilton-Pipette	Mikroliter Syringes	Hamilton, Bonaduz, GR, Switzerland
Heizblöcke	HBT 130	HLC, Ditabis, Pforzheim
Kühlschränke	MF (-20°C) MC (4°C) VIP series -86 °C	Porkka, Hollola, Finnland Porkka, Hollola, Finnland Sanyo, Bad Nenndorf
Magnetrührer	MR 2002	Heidolph, Schwabach
Mikroskope	Lichtmikroskop Telaval 31 Konfokales Lasermikroskop TCS SP2	Zeiss, Jena Leica, Solms
Mikrotom	RM2135	Leica, Solms
Nitrozellulosemembran	Protran, Porengröße 0,2µm	Whatman (GE Healthcare), Freiburg
Objektträger	Menzel-Gläser	ThermoScientific, Waltham, MA, USA
PCR-Gerät	TProfessional	Biometra, Göttingen
pH-Gradientenstreifen	Immobiline TM DryStrips, pH 3–11, 13 cm	GE Healthcare, Freiburg
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick, Berlin
Pipetten	Pipetus akku Pipetman	Gilson, Middleton, WI, USA
Präzisionswaage	H120	Sartorius, Göttingen
Quarzküvette	Uvette	Eppendorf, Hamburg
Rotationsinkubator	Gir/Min	Fröbel Labortechnik, Lindau
Schüttelinkubator	C24 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA
Schwenker	Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Spannungsgerät	PowerPac Universal	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Spannungsgerät (Isoelektrische Fokussierung)	Ettan IPGphor IEF system	GE Healthcare, Freiburg
Sterilbank	HERA safe	Haereus, Hanau
q-RT-PCR-Gerät	Mx3000P Thermocycler	Stratagene, Santa Clara, CA, USA
UV-transilluminierte Arbeitsbank	High Performance Ultraviolet Transilluminator	UVP, Upland, CA, USA
Vortexer	REAX 2000	Heidolph, Schwabach
Whatman-Filterpapier	Grad I	Whatman (GE Healthcare), Freiburg
Wasserbäder	Paraffin-Streckbad	GFL, Hannover

Zellfilter der Porengröße 50 µm	Filcons	DakoCytomation, Hamburg
Zellkulturschalen	Tissue Culture Dish	Sarstedt, Nürnberg
Zellschaber	25 cm	Greiner, Pleidelsheim
Zentrifuge	Labofuge 400R	Haereus, Hanau
Zentrifuge	Universal 30RF	Hettich, Tuttlingen

Dargestellt sind alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte mit ihrer Herstellerbezeichnung (soweit vorhanden) sowie der Firma, von der sie bezogen wurden.

3 Methoden

3.1 Zellbiologie

3.1.1 Zellkultur

3.1.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden in einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden standardmäßig bei einer Temperatur von 37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit (RH) von 95% und konstantem Kohlendioxidgehalt von 5% kultiviert. Das Nährmedium DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) enthielt 10% fötales Kälberserum, 25mM HEPES und wurde mit Amphotericin, Gentamicin, Penicillin und Streptomycin sowie mit L-Glutamin supplementiert.

3.1.1.2 Passagieren von Zellen

Mittels Mikroskop wurde der Grad der Konfluenz der Zellkultur überwacht. Sobald die Zellen den Grund der Schale ausreichend besiedelt hatten, wurden die Zellkulturen je nach Wachstumsgeschwindigkeit alle 2-5 Tage geteilt („gesplittet“) und auf neue Zellkulturschalen überführt. Hierzu wurde zunächst das Nährmedium entfernt und Reste des Trypsininhibitor haltigen Mediums durch Waschen mit PBS entfernt. Die Lösung der Zellen von der Kulturschale erfolgte durch Inkubation mit 1ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,025% Trypsin; 0,05% EDTA) pro 10 ml Zellkultur für ca. 10 min bei 37°C, 5% CO₂. Durch den Chelator EDTA werden die für die Zell-Zell-Adhäsion notwendigen Ca²⁺-Ionen gebunden. Trypsin spaltet enzymatisch die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Proteine. Die erfolgreiche Ablösung der Zellen aus ihrem Verband wurde unter dem Mikroskop überprüft. Die so gelösten Zellen wurden dann in frischem Nährmedium resuspendiert und in neue Kulturschalen überführt.

3.1.1.3 Auftauen von Zellen

Um Zellen, die bei -196°C in flüssigem Stickstoff oder -80°C aufbewahrt wurden, zur weiteren Kultivierung aufzutauen, erfolgte eine Inkubation in einem Wasserbad bei 37°C. Anschließend wurden Reste des DMSO-haltigen zytotoxischen Einfriermediums durch Zugabe von 9ml vorgewärmtem Nährmedium sowie nachfolgender Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes entfernt. In neuem Medium resuspendiert wurden die Zellen in Kulturschalen überführt und unter oben genannten Bedingungen kultiviert.

3.1.1.4 Einfrieren von Zellen

Die langfristige Aufbewahrung von Zellen erfolgte in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff bei -196°C , nach vorhergehender Abkühlung der Zellen in einem speziellen Gefriermedium, um einen Zellschaden durch beim Gefrierprozess entstehende Eiskristalle zu vermeiden. Nach der Trypsinisierung wurden die Zellen bei 800rpm für 5min zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet wurde in eiskalter Gefrierlösung (10% DMSO/ 90% DMEM, v/v) resuspendiert und in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden nach langsamer Abkühlung auf -80°C (Mr. Frosty, Nalgene) in flüssigem Stickstoff (-196°C) verwahrt.

3.1.2 Transfektionen und Assays

3.1.2.1 Transfektion mit Plasmiden

Die zu transfizierenden Zellen wurden in einer Kulturschale mit Lipofectamin-Reagenz und dem entsprechenden Plasmid inkubiert. Zunächst wurde Lipofectamin nach Herstellerangaben mit der entsprechenden Menge des Plasmides zur Komplexbildung 15 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in das Nährmedium der Zellen gegeben. Dabei wurde für jeden Ansatz je eine Kulturschale mit einem GFP-Pin1-Plasmid und als methodische Kontrolle eine weitere Kulturschale mit leerem GFP-Vektor transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden nach 24stündiger Inkubation in ihren Kulturschalen zunächst in Methanol (-20°C) fixiert und daraufhin zunächst in PBS und anschließend in a.d. gewaschen. Zuletzt wurde DAPI zur Kernfärbung in einer Verdünnung von 1:200 hinzugefügt. Zur Konservierung der Präparate wurden die Deckgläser mit „Fluorescent Mounting Medium“ (Dako) auf den Objektträgern fixiert und mit klarem Nagellack versiegelt. Die Lagerung erfolgte in einer lichtundurchlässigen Box bei 4°C . Die GFP- bzw. die FITC-Signale wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Olympus, Hamburg) untersucht und dokumentiert.

3.1.2.2 Transfektion mit siRNA

Die zu transfizierenden Zellen wurden in einer 6cm-Kulturschale gezüchtet bis eine Konfluenz von 70% erreicht wurde. 256 ng siRNA wurde in serumfreiem Medium mit 20 μl HiPerFect[®]-Reagenz entsprechend der Herstellerangaben vermengt, für 10 min bei Raumtemperatur zur Komplexbildung inkubiert und anschließend tropfenweise den Zellen zugegeben und gemischt. Die Zellen wurden dann unter üblichen

Kulturbedingungen für vier Stunden inkubiert. Zu jedem Transfektionsversuch wurden als Kontrolle Zellen mit der gleichen Menge an scrambled siRNA transfiziert. Aus den transfizierten Zellen wurden dann Lysate hergestellt (siehe Kapitel 3.1.3.1) bzw. RNA extrahiert (siehe Kapitel 3.2.3).

Die siRNA-Sequenzen sind in Kapitel 2.6 aufgeführt. Als methodische Kontrolle wurde ein Konjugat aus siRNA und FITC transfiziert, um die Effizienz der Transfektion zu evaluieren.

3.1.2.3 Behandlung von Zellkulturen mit Juglone

Die HNSCC-Zellkulturen wurden mit dem Pin1-Inhibitor Juglone (5-hydroxy-1,4-Naphthalenedion) versetzt. Dafür wurde pro 6cm-Kulturschale Juglone in einer finalen Konzentration von 10 μM zugesetzt, das Kulturmedium gemischt und unter normalen Kulturbedingungen inkubiert. Die Behandlung erfolgte für jeweils folgende Zeiträume: 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 6 h. Aus den Zellen wurden anschließend Lysate (siehe Kapitel 3.1.3.1) hergestellt oder es erfolgte die Ermittlung der noch vitalen Zellfraktion nach der Trypanblau-Ausschlussfärbung. Die Zellen wurden mit Trypan-Blau versetzt. Anschließend wurden die Fraktionen toter bzw. vitaler Zellen in einem Hämozytometer gemessen.

3.1.2.4 Zellzyklusanalyse

HNSCC-Zellen wurden gezüchtet, bis sie zu ca. 70% konfluent waren. Die Zellen wurden trypsinisiert. Alle Zellen inklusive des Überstandes, der die toten Zellen enthielt, wurden in Ethanol fixiert. Daraufhin wurden sie für 1 h mit 50 $\mu\text{g/ml}$ RNase A inkubiert, um eine mögliche Bindung von Propidiumjodid an RNA auszuschalten. Anschließend wurden sie durch einen Filter mit der Porengröße 50 μm geführt, um größere Zellaggregate zu entfernen. Dann erfolgte die Färbung mit 125 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumjodid. Die Zellen wurden dann der FACS-Analyse (BD FACSCalibur Flow Cytometer, Becton Dickinson, Heidelberg) zugeführt. Die Ergebnisse wurden mit der ModFitLT software ausgewertet. Wahlweise erfolgte auch die Färbung der Zellen mit Annexin V nach dem Herstellerprotokoll. Die Propidiumjodid-Signale wurden von den Annexin V-FITC-Signalen getrennt betrachtet. Somit konnte selektiv die Population lebender Zellen bestimmt werden, die in Apoptose eintraten. Die Daten wurden mit der Durchflusszytometrie-Software FlowJo (Tree Star, Inc. Ashland) ausgewertet.

3.1.3 Proteinchemische Analysen

3.1.3.1 Herstellung von Zellysaten

Zellysate wurden aus Tumorzellen und Tumorgeweben sowie aus normaler Mukosa gewonnen und in der SDS-PAGE-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.1.3.4) bzw. in der 2D-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.1.3.8) aufgetrennt. Sollten Lysate aus Zellen hergestellt werden, so mussten die in der Kulturschale adhärent wachsenden Zellen zunächst wie in Kapitel 3.1.1.2 beschrieben trypsinisiert, anschließend in 8ml frischem Nährmedium gelöst und in 14ml Kunststoffröhrchen überführt werden. Das Medium wurde abzentrifugiert (5min bei 800rpm) und verworfen, das Zellpellet in 8ml PBS gelöst und wiederum zentrifugiert (5min bei 800rpm). Das Zellpellet wurde in zwei Volumenteil eiskaltem Lysispuffer (siehe Kapitel 2.3) gelöst, die Suspension in 1,5ml-Eppendorfgefäße überführt und für 15min bei 4°C unter ständiger leichter Durchmischung inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge bei 10 000 rpm zentrifugiert. Die Proteine befanden sich nun im klaren Überstand, welcher in neue Eppendorf-Gefäße überführt und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden konnte. Es folgte die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode (siehe Kapitel 3.1.3.2). Sofern Lysate aus Patientengewebe (sowohl Tumorgewebe als auch normale Mundschleimhaut) hergestellt werden sollten, wurde etwa 200mg Patientengewebe mit flüssigem Stickstoff übergossen und mit einem Mörser zu feinem Pulver zermahlen. Unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff wurde das so gewonnene Pulver in ein Eppendorfgefäß überführt, mit zwei Volumenteil Lysispuffer versetzt, 15min lang inkubiert und anschließend zentrifugiert. Auch hierbei wurde die Konzentration des gewonnenen Lysates mittels der Bradford-Methode ermittelt.

3.1.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

1976 nutzte Bradford die Beobachtung, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung aus Coomassie-Brilliant-Blau G-250 von 465 nm zu 595 nm verschiebt, wenn Proteine gebunden werden (Bradford, 1976) Da sich Extinktion und Proteingehalt dabei annähernd proportional zueinander verhalten, ließ sich daraus die Konzentrationen von Proteinen bestimmen. Hierzu wurde das Bradford-Reagenz (BioRad) zunächst mit Aqua dest. Im Verhältnis 1:5 verdünnt. 3 µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden mit 1 ml verdünntem Bradford-Reagenz versetzt und nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in Einmal-Halbmikroküvetten

umgefüllt. Die Extinktion der Proben wurde gegen einen Leerwert (3 µl Lysispuffer in 1 ml verdünntem Bradford-Reagenz) bei 595 nm gemessen. Um die absoluten Proteinkonzentrationen zu ermitteln, wurde eine Standard-Eichkurve mit definierten Konzentrationen an Rinderalbumin (BSA, 1 mg/ml Stammlösung) erstellt (siehe Abbildung 4).

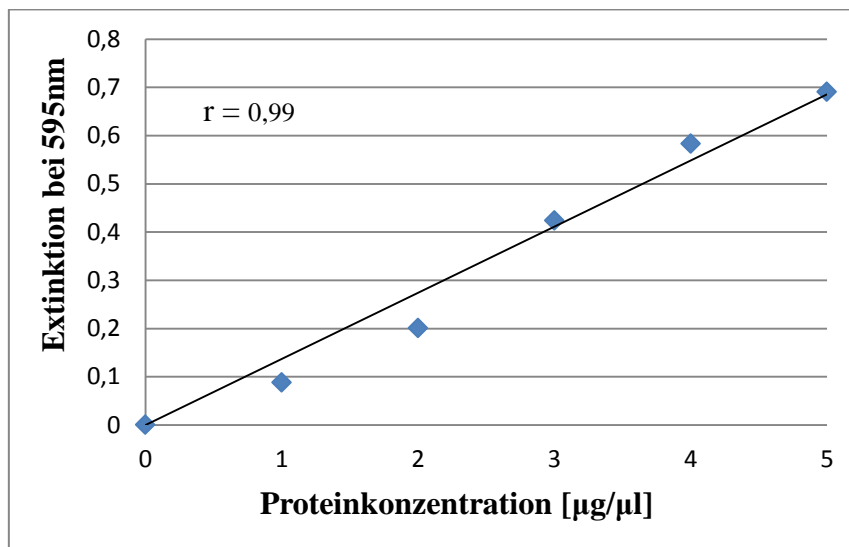


Abbildung 4. *Extinktionsmessung einer Standardreihe* Beispiel für eine Standardreihe, die zeigt, dass die Extinktion der Proteinlysate mit steigender Proteinkonzentration zunimmt und somit mit einem Korrelationskoeffizienten (r) von 0,99 proportional ist. Die Proteinkonzentration der untersuchten Proben kann anhand ihrer Extinktion mittels der Ausfallgeraden ermittelt werden.

3.1.3.3 Immunpräzipitation und Behandlung mit Alkalischer Phosphatase

Normalgewebe wurden mit Lysispuffer, wie in Kapitel 3.1.3.1 beschrieben, inkubiert. Auf einem Rotationsinkubator wurden die Lysate mit Pin1-Antikörper bei 4° C für 3 h inkubiert. Nach Zugabe von 20µl Protein A/G Plus-Agarose gemäß den Herstellerangaben wurde für eine weitere Stunde inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation von 1 min bei 4°C und 13 000 rpm wurde der Überstand verworfen. Das verbliebene Pellet wurde je einmal in Lysispuffer und anschließend in PBS gewaschen. Die Proteinlysate wurden anschließend mit alkalischer Phosphatase (*calv intestinal alkaline phosphatase*, CIP) behandelt. Hierzu wurde das Lysat mit dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer (1x NEB) in einer Konzentration von 1µg/10µl gemischt und anschließend mit CIP in einer Konzentration von 1 U/µg Protein versetzt. Das Gemisch wurde bei 37°C für 1 h inkubiert. Nach der Behandlung mit CIP wurden die Lysate in der 2D-Gelelektrophorese untersucht (siehe Kapitel 3.1.3.8).

3.1.3.4 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen aus Zellysaten erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli, 1970). SDS denaturiert Proteine und geht nichtkovalente Wechselwirkungen mit hydrophoben Bereichen ein. Durch die komplette Entfaltung der Aminosäurekette und deren Besatz mit SDS werden Ladungsunterschiede aufgehoben. Die Proteine, die nun alle negativ geladen sind, wandern im elektrischen Feld zur Anode, und trennen sich nur nach ihrem Molekulargewicht auf. Die Geschwindigkeit, mit der die Proteine das unter elektrischer Spannung stehende Polyacrylamid-Gel durchwandern, wird also nicht mehr durch ihren isoelektrischen Punkt sondern durch ihr Molekulargewicht und die Durchlässigkeit des Gels (Konzentration von Acrylamid) beeinflusst. Für die Auftrennung der Proteine wurden SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet, die aus einem oberen Sammelgel (um scharfe Banden zu erzielen) und einem unteren Trenngel bestanden, welches die Proteine je nach ihrem Molekulargewicht unterschiedlich schnell durchlaufen und so aufgetrennt werden. Zur Herstellung der Gele wurden die Glasplatten, die bereits mit eingebauten Spacern erhältlich waren, mit Ethanol gesäubert, mit Klammern zusammengesetzt und unten mit einem Gummibelag abgedichtet. Für 20 ml Trenngel wurden 8,2 ml Acrylamid-Stammlösung, 5 ml 1,5 M Tris-Puffer pH 8,8, 200 µl 20% SDS, 200 µl APS (10%) und 20 µl TEMED mit a.d. gemischt und nach kurzem Vortexen in die Gelapparatur gegossen. Um eine glatte Oberfläche zu erhalten, wurde das noch unpolymerisierte Gel mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständigem Auspolymerisieren wurde das Isopropanol entfernt. Für das Sammelgel wurde 2 ml Acrylamid-Stammlösung mit 2,5 ml 0,5M Tris-Puffer pH 6,8, 100 µl 20% SDS, 100 µl 10% APS, 10 µl TEMED und 5,4 µl a.d. gemischt, über das Trenngel gegossen. Dann wurde sofort vorsichtig unter Vermeidung von Luftblasenbildung ein Gelkamm eingesetzt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurde der Gelkamm entfernt, das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit 1x SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Definierte Mengen der Proteinproben (40 µg) wurden durch Zugabe von NP40-Lysispuffer auf identische Volumina gebracht und mit der gleichen Menge 2xSDS-Probenpuffer versetzt und für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Nach kurzem Zentrifugieren wurden sie dann mittels einer Hamiltonpipette in die Taschen des Gels geladen. Auf dem Acrylamidgel wurden stets 5µl eines molekularen Protein-Massenstandards (siehe Kapitel 2.7) mit aufgetrennt. Die Proteine wurden für 15 Minuten bei 70 Volt im etwa 1cm hohen Sammelgel fokussiert, dann weitere 1,5

Stunden bei konstant 100 Volt aufgetrennt bis der Farbstoff des Massenstandards an den unteren Gelrand gewandert war. Anschließend wurde das Gel für die Western Blot Analyse eingesetzt.

3.1.3.5 Protein-Transfer

Um die aufgetrennten Proteine weiterhin immunologisch untersuchen zu können, wurden diese nach ihrer Auftrennung vom Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran mittels Nass-Blot-Verfahren transferiert (Towbin et al., 1979). Die Nitrozellulose-Membranen wurden vor dem später folgenden Blockvorgang stets mit Handschuhen angefasst, um eine Kontamination mit Proteinen zu vermeiden. Die Membran wurde anschließend zunächst zusammen mit Schaumstoffkissen und Filterpapier in Transferpuffer (siehe Kapitel 2.3) äquilibriert. Von der Anode zur Kathode hin wurden zunächst ein Schaumstoffkissen, dann ein Filterpapier, dann die Nitrozellulose-Membran, das zu transferierende Acrylamid-Gel, dann wiederum ein Filterpapier und ein Schaumstoffkissen geschichtet (siehe Abbildung 5). Um die Bildung von Luftblasen, die einen Proteintransfer im elektrischen Feld verhindern würden, zu vermeiden, wurden die Transfereinheit nach allen Seiten hin mit einer 10ml Pipette ausgerollt und anschließend in die Blot-Kassette geklemmt. Diese wurde senkrecht in den Blotcontainer gestellt und die ganze Apparatur mit vorgekühltem (4°C) Transferpuffer gefüllt. Um eine Überwärmung zu vermeiden, wurde der Transfer in einem Kühlraum bei 4°C durchgeführt und die Transferapparatur zusätzlich mit einem Kühlelement versehen. Die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100V über 1h. Die mit Proteinen besetzte Nitrozellulosemembran wurde anschließend für 30 min unter ständigem Schwenken in Milch geblockt, um unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran zu besetzen. Bei der weiteren Behandlung der Membran war stets darauf zu achten, diese nicht austrocknen zu lassen. Die Membranen wurden in Frischhaltefolie gewickelt und bei 4°C aufbewahrt, im Falle, dass sie nicht unmittelbar für weitere Untersuchungen eingesetzt wurden.

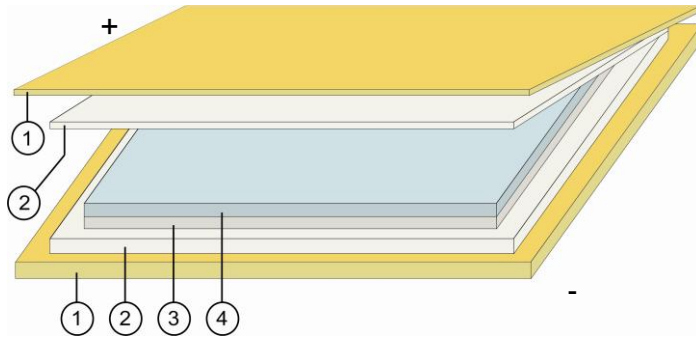


Abbildung 5. Anordnung in der Blotkammer. 1 = Schaumstoff, 2 = Filterpapier, 3 = Acrylamidgel, 4 = Nitrozellulosemembran.

3.1.3.6 Protein-Detektion

Nach dem Blockvorgang erfolgte der Nachweis von spezifischen interessierenden Proteinen. Der Antikörper gegen das zu untersuchende Protein wurde entsprechend der Herstellerangaben in Blockpuffer verdünnt und bei 4°C mit der Membran auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran 3x10min mit Blockpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe eines passenden horse-radish-Peroxidase(HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpers (in Blockpuffer geeignet verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde die Membran erneut dreimalig in Blockpuffer gewaschen und anschließend in PBS geschwenkt. Nach Zugabe der luminolhaltigen ECL-Lösung (Enhanced Chemiluminescence), dem Substrat für die am Sekundärantikörper befindliche Peroxidase, entsteht die Chemolumineszenz. Hierzu wurden die Detektionsreagentien 1 (Peroxidlösung) und 2 (Luminol Enhancerlösung) in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und unmittelbar danach für eine Minute auf die Membran gegeben. Unmittelbar nach der Zugabe der Detektionsreagenzien wurde die Membran in einer Röntgenkassette platziert und einem Röntgenfilm (Kodak Biomax MR) exponiert. Die durch die an den Zweitantikörper gekoppelte horse-radish-Peroxidase katalysierte Farbreaktion schwärzt den Film an den Stellen, wo sich auf der Membran das nachzuweisende Protein befindet. Das Ausmaß der Schwärzung des Filmes ist dabei in gewissen Grenzen proportional zu der Menge an gebundenem Antikörper und somit auch der ungefähren Menge an nachzuweisendem Protein.

3.1.3.7 „Stripping“ von Nitrozellulosemembranen

Stripping bedeutet die Entfernung eines Antigen-gebundenen Antikörpers von der Membran. Diese Methode wurde angewandt, wenn auf einer Membran nach einem erfolgten Proteinnachweis noch ein weiteres Protein detektiert werden sollte, welches ein ähnliches Molekulargewicht aufwies wie das zuerst untersuchte Protein, so dass sich

die resultierenden Signale überlagern würden. Hierzu wurde die Membran zunächst mit PBS gespült und anschließend für 30min in einem 50°C warmen Wasserbad in Strip-Puffer (siehe Kapitel 2.3) unter sanftem Schwenken inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Membran stets vollständig mit Lösung bedeckt war. Daraufhin wurde die Membran in zweimal 15minütigen Waschgängen in PBS / Tween 20 (1:2000) vom Strip-Puffer gereinigt. Bevor die Membran dann wieder erneut mit einem neuen Erstantikörper gefärbt werden konnte, wurde sie zunächst in Blockpuffer inkubiert.

3.1.3.8 2D-Gelelektrophorese

Diese Technik zur zweidimensionalen Proteinalalyse wurde 1975 von O'Farrell entwickelt (O'Farrell, 1975). Dabei werden zwei Trennprinzipien kombiniert. Die erste Dimension umfasst die Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (isoelektrische Fokussierung). In der zweiten Dimension werden die Proteine durch eine herkömmliche SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Zunächst wurden die entsprechenden Zelllysate hergestellt und aufbereitet. Das Zellkulturmedium wurde von den Kulturplatten entfernt. Dann wurden die Zellen dreimalig in PBS und einmalig in 10mM Tris, pH 7,0/25mM Sorbitol gewaschen. Danach wurden 6 ml des gleichen Tris/Sorbitolgemisches auf die Kulturplatten gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber vom Grund mobilisiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt, für 5 min bei 3800 rpm zentrifugiert, wonach der Überstand verworfen wurde. Das verbliebene Zellpellet wurde in 200 µl 2D-Probenpuffer resuspendiert.

Im Falle, dass Gewebeproben in der 2D-Gelelektrophorese untersucht werden sollten, wurden diese Gewebe zunächst unter Zugabe von flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zu Pulver zermahlen und dann in zwei Volumenteilen 2D-Probenpuffer gelöst.

Die Zell-Probenpuffergemische wurden zunächst für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend bei 4°C für 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode ermittelt. Die Lysate wurden entweder direkt in der 2D-SDS-PAGE eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

Für die 2D-Gelelektrophorese wurde bei den zu untersuchenden Lysaten eine gleiche Proteinkonzentration eingestellt, wobei 150 µg Protein mit 2D-Probenpuffer auf ein Endvolumen von 220 µl gebracht wurden. IPG-Puffer, der Ampholyte des pH-Bereichs von pH 3 bis pH 11, sowie 0,1%iges Bromphenolblau enthält, wurde jeweils 1%ig

hinzugefügt. Die Proben wurden dann auf einen 13 cm langen immobilisierten pH-Gradientenstreifen des gleichen pH-Bereichs gegeben, mit Mineralöl abgedeckt und mit der Gelseite nach unten bei Raumtemperatur für 16 h inkubiert, so dass die Protein/Ampholytelösung den Gradientenstreifen hydratisiert und in diesen vollständig eintritt (Rehydratisierung des Gradientenstreifens). Dabei wurde stets ein 2D-SDS-PAGE-Standard als interne Kontrolle mitgeführt. Nach dem Rehydratisierungsvorgang wurden die Streifen kurz in deionisiertem Wasser gereinigt und dann zur isoelektrischen Fokussierung in ein Spannungsgerät mit der sauren Seite zum Pluspol eingespannt. Auf die Streifenenden wurden mit deionisiertem Wasser befeuchtete Filterpapierstreifen gelegt. Zusätzlich wurde auf die basische Seite ein in 500 µl 15 mM DTT getränkter Filterpapierstreifen gelegt. An den befeuchteten Filterpapierstreifen wurden die Elektroden befestigt. Der Streifen wurde mit Mineralöl bedeckt.

Die isoelektrische Fokussierung fand bei konstanten 20°C in den in der Tabelle 12 dargestellten Schritten statt.

Tabelle 12. Stufenschema für die isoelektrische Fokussierung

Stufe	Spannung (V)	Vh
1	0-100 (gradient)	50
2	100-400 (gradient)	800
3	400-3500 (gradient)	3997
4	3500 (konstant)	3500
5	3500-8000 (gradient)	6037
6	8000 (konstant)	99867
7	500 (konstant, bis zur Weiterverarbeitung der Strips)	

Programm der isoelektrischen Fokussierung von 13 cm IPG-Streifen

Danach folgte die SDS-PAGE-Gelelektrophorese als zweite Dimension der Auftrennung. Zunächst wurde der Gradientenstreifen, welcher die nach der ersten Dimension aufgetrennten Proteine enthält, äquilibriert. Hierzu wurde der Streifen in 10ml SDS-Äquilibrierpuffer / DTT (100 mg/10 ml Puffer) für 15 min auf einem Schüttler inkubiert, anschließend nochmals für die gleiche Zeit in SDS-Äquilibrierpuffer / Iodoacetamid (250 mg/10 ml Puffer) inkubiert. Darauf folgte die Gelelektrophorese der zweiten Dimension. Hierzu wurde der Gradientenstreifen auf ein 12%iges SDS-

Polyacrylamid-Gel (siehe Kapitel 3.1.3.4) aufgelegt und mit Agarose-Versiegelungslösung bedeckt. Die Gele liefen bei einer konstanten Spannung von 100 V für 30 min, anschließend bei 150 V, bis das Bromphenolblau (MW: 0,67 kDa) die Unterseite des Gels erreicht hatte. Der Protein-Standard Precision Plus Protein™ Standards (161-0373) wurde mit aufgetrennt.

Nach der Elektrophorese erfolgte der Proteintransfer. Das Gel wurde aus der Apparatur entnommen, die überschüssigen Enden des Gels abgeschnitten und die Fläche gemessen, damit die Stromstärke für den Transfer berechnet werden konnte. Das Gel wurde in Transferpuffer gelegt. Dann wurde wie beim konventionellen Western Blot ein „Sandwich“ aus den Schichten Blotting Papier, Gel, Nitrozellulosemembran, Blottingpapier gebaut. Alle Bestandteile wurden vorher gut mit Transferpuffer befeuchtet. Der Transfer der Proteine erfolgte in einer Semi-Dry Blotting Kammer für eine Stunde geblottet. Die verwendete Stromstärke (mA) entsprach dabei dem ca. 1-1,5-Fachen der Gelfläche (cm²). Um anschließend das Ergebnis des Transfers zu beurteilen und die Proteinbanden des Standards zu visualisieren, wurden die Nitrozellulosemembranen mit Ponceau S gefärbt. Die Membran wurde dann in 3% Milchpulver/PBS geblockt. Die Proteindetektion erfolgte wie in Kapitel 3.1.3.6 beschrieben.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung und Transformation von Bakterien

Transformationskompetente DH5 α -Bakterien (Hanahan, 1983) wurden zunächst langsam auf Eis aufgetaut. 1 μ l des Plasmides, mit dem die Bakterien transformiert werden sollten, wurde zu 50 μ l der Bakteriensuspension gegeben und diese anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nun erfolgte der Hitzeschock für 45 Sekunden im Wasserbad bei 42 °C. Im Anschluss daran wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium ohne Ampicillin überführt. Die Kultur wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf ampicillinhaltige LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C bebrütet. Bei der Bebrütung auf ampicillinhaltigem Agar kommt es zur Selektion erfolgreich transformierter Bakterien, da nur diese die auf dem Plasmid kodierte Ampicillinresistenz tragen.

3.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmidaufreinigungen in präparativem Maßstab wurden säulenchromatographisch mit dem QIAprep Spin MIDIPrep Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Dazu wurden E.coli-Übernachtskulturen (in 25ml LB-Medium) verwendet.

3.2.3 Präparation von RNA aus Zelllinien und Geweben

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den zu untersuchenden Geweben und Zelllinien erfolgte säulenchromatographisch mit dem RNeasy MIDI System (Qiagen, Hilden), entsprechend der Herstellerangaben. Im Allgemeinen wurde bei den Arbeiten mit RNA mit großer Sorgfalt vorgegangen, da es sich bei den ubiquitär vorkommenden Ribonukleasen (RNAsen) um sehr stabile Enzyme handelt. Alle Gebrauchsmaterialien zum Arbeiten mit RNA wurden vor Gebrauch sorgfältig gereinigt. Während der Experimente wurden Latex-Einmalhandschuhe getragen, um die Kontamination mit RNAsen, die normalerweise auf der Haut vorkommen, zu vermeiden.

3.2.4 cDNA-Synthese

Um aus Geweben und Zelllinien extrahierte RNA für Polymerasekettenreaktionen weiterzuverwenden, musste aus der RNA zunächst cDNA synthetisiert werden. Für die Herstellung der cDNA mittels reverser Transkription (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche) wurde entsprechend des Herstellerprotokolls vorgegangen.

3.2.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren (DNA oder RNA) in einer Lösung wurden in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm) photometrisch bestimmt. Ein Aliquot der Lösung wurde 1:40 mit a.d. verdünnt und im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

3.2.6 Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die sequenzspezifische, enzymatische Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den vom jeweiligen Hersteller vorgegebenen Puffer- und Inkubationsbedingungen. Das Volumen der eingesetzten Restriktionsenzymlösung überschritt in keinem Fall 1/10 des Gesamtvolumens des Reaktionsansatzes, um die Reaktion durch das in der Enzymlösung enthaltene Glycerin nicht zu beeinträchtigen. Zumeist wurde 1,0 µg DNA und 0,5 µl des jeweiligen

Restriktionsenzym mit dem jeweiligen Reaktionspuffer, der vom Hersteller (New England Biolabs, Frankfurt) zum jeweiligen Restriktionsenzym mitgeliefert worden war (NEB 10xPuffer), und a.d. auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l gebracht. Die Inkubation erfolgte nach Herstellerangaben. Danach wurden die DNA-Fragmente entweder in der Gelelektrophorese aufgetrennt oder einer Ligation unterzogen.

3.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die zu amplifizierende DNA wurde in speziellen Miniküvetten mit PCR-Ready Mix (welcher bereits die Taq-Polymerase, die Nukleotide und andere Kofaktoren enthält) versetzt und in einem PCR-Gerät amplifiziert. Die idealen Reaktionsbedingungen wurden mit dem Programm Probefinder ermittelt (<http://www.universalprobelibrary.com>, Roche). Danach wurden die amplifizierten DNA-Sequenzen entweder für die Sequenzanalyse (siehe Kapitel 3.2.9) verwendet oder aber im Rahmen von Klonierungsarbeiten einem Restriktionsverdau unterzogen und anschließend in einen Vektor ligiert (siehe Kapitel 3.2.8).

3.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Um ein GFP-Pin1-Konstrukt herzustellen, wurde die amplifizierte Pin1-DNA nach dem Restriktionsverdau mit dem entsprechend linearisierten GFP-Vektor zu einem GFP-Pin1-Plasmid durch das Enzym T4-DNA-Ligase kovalent verknüpft. Hierzu wurde 1 μ l linearisiertes Plasmid zusammen mit 7,5 μ l des einzuklonierenden Pin1-DNA-Fragmentes, 0,5 μ l T4-DNA-Ligase und 1 μ l 10x T4-Puffer (vom Hersteller der Ligase mitgeliefert) bei Raumtemperatur 2 h lang inkubiert. Mit dem ligierten Vektor wurden anschließend Bakterien transformiert.

3.2.9 DNA-Sequenzierung

Um eventuelle Mutationen in der DNA-Sequenz eines Gens aufzudecken, wurde aus den zu untersuchenden Tumorzelllinien zunächst mittels des RNeasy MIDI Kits (Qiagen) die gesamte RNA entsprechend der Herstellerangaben extrahiert. Diese wurde im folgenden Schritt einer reversen Transkription (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche) laut den Herstellerangaben unterzogen. Aus der gewonnenen cDNA wurde mittels der in Kapitel 2.6 aufgeführten Primer die cDNA von Pin1 in der PCR unter Benutzung des PCR-Ready Mix herausamplifiziert. Das gesamte PCR-Produkt wurde in einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.2.10) aufgetrennt.

Die gesuchten Genabschnitte wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert (siehe Kapitel 3.2.11). Nun lag die gesuchte DNA-Sequenz in ausreichender Menge vor. Zusammen mit den in Kapitel 2.6 aufgeführten Primer wurde die DNA an die Firma 4base lab in Reutlingen geschickt, die die Sequenzierung der Pin1-DNAs der untersuchten Zelllinien durchführte.

3.2.10 Agarosegelelektrophorese

Für die Analyse von Plasmiden, die Überprüfung von Restriktionsreaktionen und Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurde eine Agarosekonzentration von 0,7 – 1,5 % gewählt. Die jeweilige Menge Agarose wurde in 1xTAE-Puffer aufgekocht, nach kurzer Abkühlungszeit mit 10 µl Ethidiumbromid pro 100ml Agarosegel versetzt und in eine mit einem Kamm versehene Gelkammer gegossen, in welcher das Gel abkühlte. Die Gelkammer wurde in die Elektrophoresekammer eingebracht, diese anschließend mit 1xTAE-Puffer und 10µl Ethidiumbromid pro 100ml Puffer bis zum Rand aufgefüllt. Die DNA-Proben wurden mit einem Fünftel ihres Volumens an DNA-Ladepuffer versetzt und in die vom Kamm geformten Geltaschen gefüllt. In den randständigen Geltaschen zu beiden Seiten der DNA-Proben wurden die in Kapitel 2.7 genannten Längenstandards DNA Marker Lambda HindIII und phiX174 HaeIII mit aufgetrennt, wodurch ein Abschätzen der DNA-Fragmentgrößen ermöglicht wird. Die DNA wurde mit 120 Volt Spannung im Gel getrennt. Durch Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid konnten die im Gel aufgetrennten DNA-Fragmente bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht werden.

3.2.11 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Die Agarosegele wurden nach der Elektrophorese unter einer UV-beleuchteten Werkbank zugeschnitten. Dabei wurde anhand des mitgeführten Längenstandards beurteilt, welche DNA-Fragmente von Interesse sind. Nachdem die DNA-Fragmente ausgeschnitten worden waren, erfolgte die Gelextraktion der DNA (QIAquick Gel Extraction Systems, Qiagen) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die Konzentration der isolierten Nukleinsäuren bestimmt. Ein Aliquot der Lösung wurde 1:40 mit a.d. verdünnt und in einer 1cm dicken Quarzglaszelle bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch vermessen.

3.2.12 Quantitative RT-PCR

Um die Aktivität eines Genes anhand der Anzahl seiner Transkripte in einer Zelle zu ermitteln eignet sich die quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). Hierbei wird zunächst die Gesamt-RNA aus einer Zelllinie extrahiert. Anschließend wird die RNA in cDNA (*complementary DNA*) mittels eines reversen Transkriptionsschrittes unter Zugabe von oligo-dT-Primern als Startermoleküle umgeschrieben. Aus diesem wiederum heterogenen cDNA-Pool kann nun mittels spezifisch an das Zielgen bindender Primer in einer Polymerase-Kettenreaktion das Zielgen amplifiziert werden. Dabei verdoppelt sich die Menge der DNA-Amplifikate bei jedem Zyklus. Nach jedem Zyklus wird die enthaltene Menge an DNA-Amplifikaten vom qPCR-Gerät photometrisch ermittelt. Indem man nach einer festgelegten Zyklusanzahl die dabei entstehende exponentielle Kurve zum Nullpunkt hin extrapoliert, kann auf die bei PCR-Beginn vorgelegene cDNA-Menge zurückgerechnet werden. Dies bildet indirekt die Menge an RNA-Transkripten in der Ursprungszellpopulation ab. Um die dabei ermittelten Unterschiede in der Menge der Transkripte des zu untersuchenden Genes zwischen den einzelnen Zelllinien zu normalisieren, wurde bei jedem qRT-PCR-Versuch parallel eine qRT-PCR mit dem Aktin-Gen als interne Kontrolle durchgeführt. Die RNA-Extraktion wurde mittels RNeasy MIDI System (Qiagen) und die cDNA-Synthese mittels Transkriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) jeweils nach Herstellerangaben durchgeführt. Die anschließende qRT-PCR wurde in einem Mx3000P Lightcycler für 45 Zyklen bei einer Temperatur von 57 C° durchgeführt. Die PCR Reaktionen wurden mit Hilfe des Absolute QPCR SYBR Green Mix und einer Primerkonzentration von 0,2 µM nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Mittels Probenfinder (<http://www.universalprobelibrary.com>) wurde der optimale real-time PCR Assay für das Pin1-Gen (NM_006221, Sequenz siehe Anhang) ermittelt. Die Primersequenzen sind im Kapitel 2.6 aufgeführt.

3.3 Immunhistochemie

3.3.1 Fixieren und Einbettung in Paraffin

Um Schnitte des Gewebes zu gewinnen, musste das Gewebe zunächst in Paraffin eingebettet werden. Dazu wurden die Gewebeproben zunächst 24h lang in 4%igem gepuffertem Formalin (pH 7,0) fixiert. Anschließend musste das Gewebe eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) durchwandern, wobei es jeweils 30min in

jeder Konzentration inkubiert wurde. Zuletzt folgte eine ebenfalls 30minütige Inkubation in Roti-Histol, bevor das Gewebe für 24h in flüssiges Paraffin gegeben wurde. Nach der Einwirkzeit konnte das Material in vorgefertigte Förmchen ausgegossen werden und als Block bei 4°C aushärten.

3.3.2 Immunhistochemische Färbung

Von den gekühlten Paraffinblöcken wurden mittels eines Mikrotoms etwa 4µm dicke Schnitte hergestellt, diese auf Objektträger gezogen und für etwa 1h bei 60°C getrocknet. Die Entparaffinierung erfolgte in Roti-Histol für 30min und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 70%). Um eine Farbreaktion durch die bereits im Gewebe vorhandene endogene Peroxidase zu unterdrücken, wurden die Schnitte 30 Minuten lang mit einem Methanol / 30% H₂O₂-Gemisch im Verhältnis 100:3 behandelt und anschließend in Leitungswasser gespült. Nun wurden die Antigene demaskiert, indem die Schnitte in einem Gefäß mit 4°C kaltem Natriumcitratpuffer aufgefüllt und bei 600 Watt in einem Mikrowellengerät in 3 jeweils 5 Minuten andauernden Durchgängen erhitzt wurden, wobei nach jedem Durchgang die verdampfte Menge Natriumcitratpuffer nachgefüllt wurde. Nach dem letzten Durchgang wurden die Schnitte zum Abkühlen bei Raumtemperatur für 15 Minuten stehen gelassen und anschließend in TBS gespült. Nach einem erneuten Spülvorgang mit Leitungswasser, wurden die Schnitte mit je 100µl Normalserum, das sich an Kollagen und Bindegewebe anlagert und so die unspezifische Bindung des Antiköpers an diesen Strukturen verhindert, bedeckt und 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Primärantikörper wurden entsprechend den Herstellerangaben in Blockpuffer oder nach gängigen Laborprotokollen verdünnt, davon jeweils 100µl auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert. Der Primärantikörper bindet hierbei an spezifische Antigene des Gewebes. Um den überschüssigen Primärantikörper zu entfernen, wurde mit PBS gespült. Anschließend der mit Biotin konjugierte passende Sekundärantikörper in verdünnter Lösung zu jeweils 100 µl auf die Schnitte gegeben, wobei er nun seinerseits an den Primärantikörper bindet. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten in der feuchten Kammer. Erneut wurde mit PBS gespült und im Anschluss der 30min vorher frisch angesetzte ABC-Komplex, (5 ml PBS, 1 Tropfen Lösung A und ein Tropfen Lösung B) zu jeweils 100µl auf die Schnitte gegeben. Beim ABC-Komplex handelt es sich um einen Peroxidase konjugierten Avidin-Biotin-Komplex, der mit den freien Stellen des Avidinmoleküls an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet. Die

Inkubationszeit für die Inkubation mit den Avidin-Biotin-Komplexen betrug ebenfalls 30 Minuten. Durch Spülen mit PBS werden die nicht gebundenen ABC-Komplexe entfernt. Die braune Farbreaktion wurde durch Hinzufügen des Substrates DAB für 15min erzielt. Das am ABC-Komplex konjugierte Peroxidase-Enzym bildet mit dem Chromogen DAB und 30%iger H_2O_2 eine braune, in Alkohol unlösliche Farbe. Nach einem Spülvorgang mit Leitungswasser, das die Färbungsreaktion stoppt, wurden die Schnitte sechsmal in eine Küvette mit Hämalaun getaucht und mit Leitungswasser gespült, um wiederum die Färbung zu stoppen. Zur Dehydratation der Schnitte wurden diese einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) unterzogen, und anschließend für 10 Minuten in Rotihistol eingelegt. Zum Eindecken wurden die Objektträger mit einigen Tropfen Corbitbalsam bestrichen und mit einem Deckglas versiegelt. Die Präparate wurden anschließend unter einem Lichtmikroskop untersucht.

4 Ergebnisse

4.1 Pin1-Proteinexpression in HNSCC-Zelllinien und -Geweben

4.1.1 Expressionsanalyse im Western Blot

Um die Expression von Pin1 in HNSCC zu untersuchen, wurde aus den in Tabelle 8 und 9 aufgeführten Zelllinien und Tumorgeweben das Gesamtprotein isoliert und mittels spezifischer Antikörper gegen Pin1 immunbiochemisch untersucht. Als Kontrollgewebe diente unveränderte normale Mukosa (Abb. 6; 1123-R, 1152-R und 1170-R) der Mundschleimhaut. Für die Normalisierung der einzelnen Gesamt-Zelllysate erfolgte ein gleichzeitiger Nachweis von β -Aktin. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 6 dargestellt.

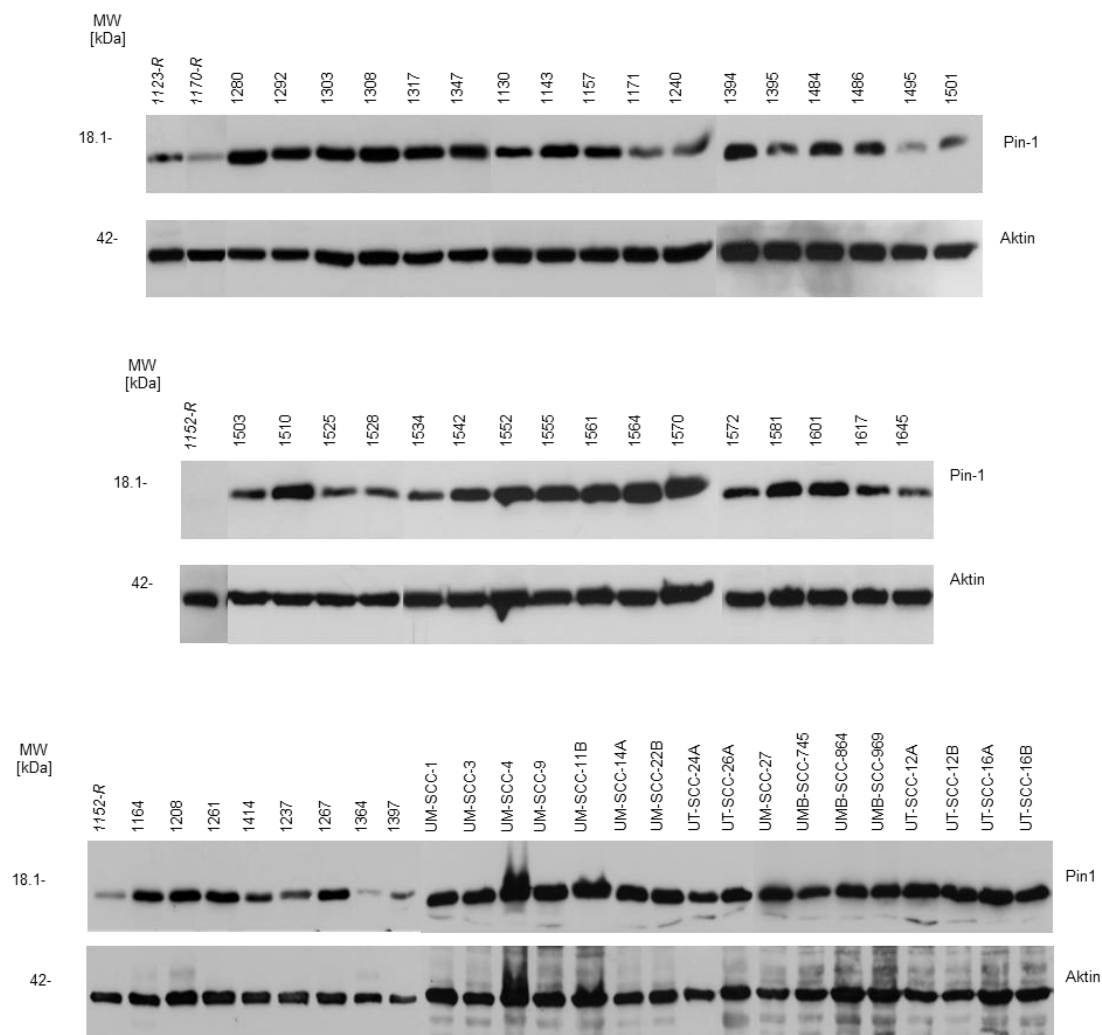


Abbildung 6. Pin1-Expression in HNSCC-Tumorgeweben und -zelllinien. Abgebildet ist die Pin1-Expression (obere Reihen) in den in Tab. 8 und 9 aufgeführten Tumorgeweben und -zelllinien verglichen mit den Referenzgeweben normaler Mundschleimhaut (1123-R, 1152-R und 1170-R), die mittels Western Blot untersucht wurden. Als Ladekontrolle diente β -Aktin (untere Reihen). Pin1 wird in nahezu allen Tumorgeweben stärker exprimiert als in den

Normalgeweben. Die Expression in Tumorzelllinien fällt noch höher aus. (Die Kontrolle 1152-R ist zum Vergleich doppelt dargestellt).

Wie man in der Abbildung 6 erkennen kann ist die Intensität der Signale für Pin1 bei den meisten Proben aus HNSCC-Geweben im Vergleich zu den Normalgeweben sehr viel stärker. Dies lässt auch auf eine höhere Menge an Pin1-Protein in den tumorösen Geweben schließen als in den klinisch unauffälligen Normalgeweben. Auch bei den aus HNSCC abgeleiteten Tumorzelllinien zeigt sich ein ähnliches Bild. Auch hier erscheint die Signalintensität des Pin1 im Vergleich zu Kontrollgeweben deutlich stärker. Dass die Signalintensität bei den Tumorzelllinien noch kräftiger erscheint als bei den Tumorgeweben, könnte daran liegen, dass in den Gewebeproben noch ein Anteil an Tumorstroma vorhanden war. Hierdurch könnten neben den epithelialen Karzinomzellen auch nichtkarzinomatöse Bindegewebsanteile, wie Fibroblasten, Endothel- und Blutzellen erfasst worden sein, bei welchen die Pin1-Menge geringer ist, als bei den Tumorzellen.

4.1.2 Expressionsnachweis in der Immunhistochemie

Auch histologisch wurde die Expression von Pin1 in Tumorgeweben mittels immunhistochemischer Färbung von Formaldehyd-fixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten untersucht. Als Kontrolle wurde dasselbe Tumorgewebe mit unspezifischem Kaninchen-IgG und anschließend mit Biotin-gekoppelten Sekundär-Antikörpern inkubiert und analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Farbreaktion nur in den mit anti-Pin1-Antikörpern inkubierten Schnitten sichtbar war, und hier den epithelialen Tumoranteilen anfärbte. Das Tumorstroma blieb hingegen ungefärbt. Bei den Tumorzellen ließ sich beobachten, dass Pin1 zytoplasmatisch nachweisbar ist, vor allem aber im Kern lokalisiert.

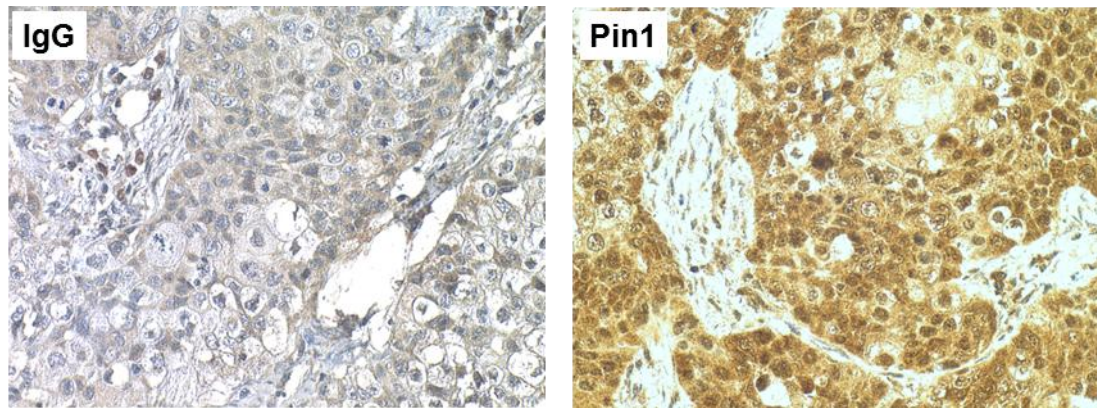


Abbildung 7. Immunhistochemische Färbung von Pin1 in HNSCC-Gewebe. Abgebildet ist rechts ein Gewebeschnitt aus einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches, der immunhistochemisch mit Pin1-Antikörpern gefärbt wurde. Hier zeigt sich sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär ein deutlich positives Signal. Als Kontrolle wurde der links abgebildete Schnitt mit unspezifischen Kaninchen-IgGs inkubiert und parallel gefärbt. (Vergrößerung 20fach.)

4.1.3 Zytochemische Expressionsanalyse und subzelluläre Lokalisation

Um die Lokalisation von Pin1 auch zytologisch zu untersuchen, wurde die cDNA von Pin1 wie in Abschnitt 3.2 beschrieben im passenden Leserahmen in das GFP-Plasmid hineinkloniert und die HNSCC-Tumorzelllinie UM-SCC-3 mit jenem GFP-Pin1-Konstrukt transient transfiziert. Wie die fluoreszenzmikroskopische Auswertung in Abb. 8 zeigt, lokalisiert das GFP-Pin1-Fusionsprotein diffus im Zytoplasma, aber auch hier wird durch den Pin1-Anteil das Fusionsprotein massiv in den Zellkern transportiert. Im Zellkern lokalisiert es ebenfalls diffus im Nukleoplasma, unter Aussparung der Nukleoli.

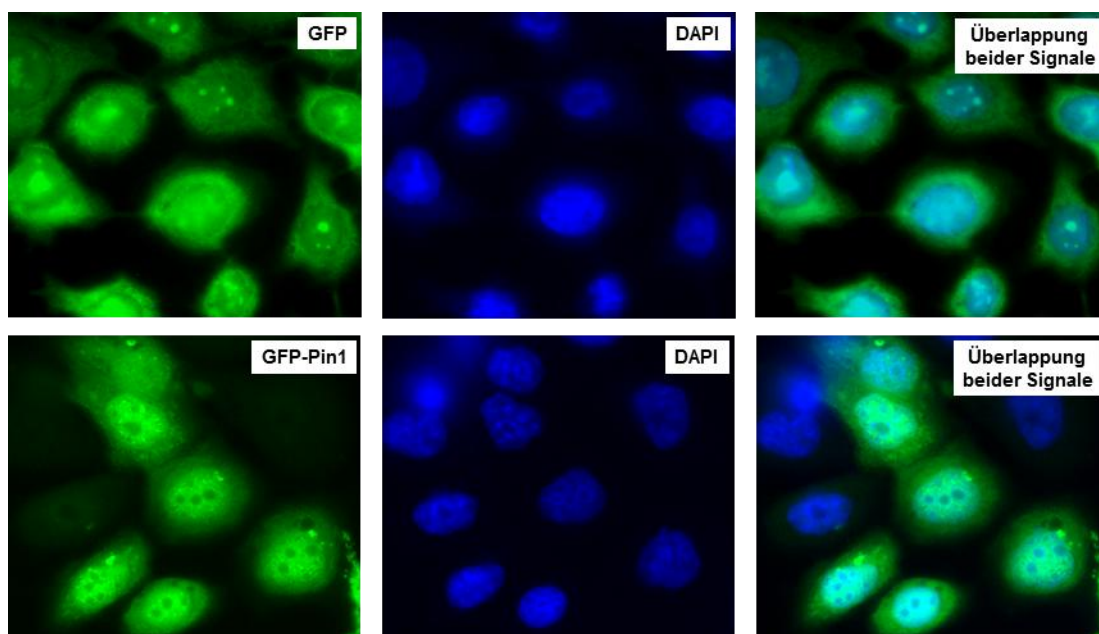


Abbildung 8. Zytochemische Darstellung von Pin1 in einer HNSCC-Tumorzelllinie. In der linken Spalte ist die Fluoreszenz von GFP alleine (oben) oder des GFP-Pin1-Konstrukts

dargestellt. GFP-Pin1 lokalisiert sowohl in Zytoplasma als auch im Zellkern unter Aussparung der Nukleoli. Die mittleren Aufnahmen zeigen die Gegenfärbung der Kerne mit DAPI, und in der rechten Bildreihe sind beide Signale überlappend dargestellt. (Vergrößerung 100fach.)

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.1.2.1 beschrieben zusätzlich mit DAPI gefärbt, um den Kern der Zelle sichtbar zu machen. Bei Transfektion des leeren GFP-Vektors findet sich das eingebrachte Protein diffus in der gesamten Zelle, gelegentlich sind die Nukleoli deutlich markiert.

4.2 Pin1-Expression auf RNA-Ebene

Um näher abzuklären, ob die beobachteten erhöhten Pin1-Proteinmengen in Tumorgewebe und -zelllinien durch eine vermehrte Transkription und Translation oder aber durch andere Mechanismen, wie zum Beispiel Hemmung des Proteinabbaus, bedingt sind, wurden die Mengen an in der Zelle und im Gewebe vorliegenden Pin1-Gen-Transkripten mittels einer quantitativen Polymerasekettenreaktion (quantitative RT-PCR) untersucht. Um die Anzahl der Pin1-Transkripte der Zelllinien und Gewebeproben vergleichen zu können, wurden die RNA-Proben auf gleiche Konzentration und gleiches Volumen gebracht und anschließend der gleichen Anzahl von Amplifikationszyklen unterzogen. Dabei wurde als Kontrolle das Referenzgen Aktin mitanalysiert, um eine Normalisierung der Ergebnisse zu ermöglichen. Wie der Abbildung 9 zu entnehmen, sind unterschiedliche mRNA-Mengen von Pin1 in den jeweiligen Proben nachweisbar. Die höchste Anzahl an Pin1-Transkripten fand sich in den Tumorzelllinien. Die niedrigste Anzahl war in den Normalgewebe zu finden. Die Tumorgewebe enthielten weniger Transkripte als die reinen Lysate von Tumorzelllinien, aber mehr als die Normalgewebe. Dies könnte wiederum mit dem vermuteten Verdünnungseffekt durch die Heterogenität der Tumorgewebe zusammenhängen.

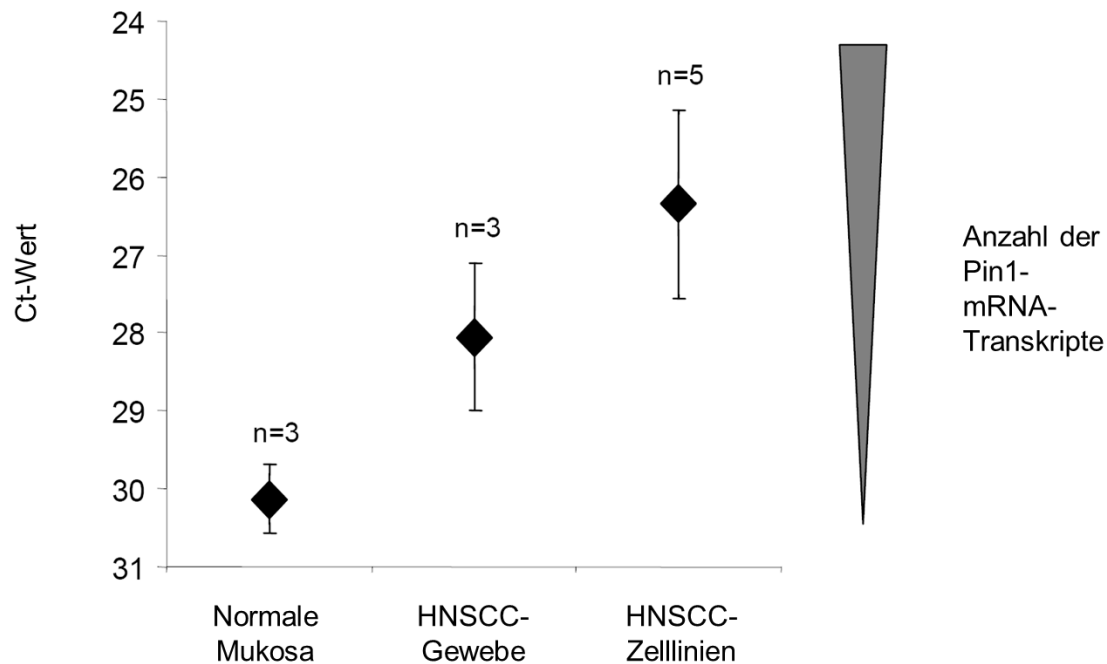


Abbildung 9. Expressionsanalyse mittels qRT-PCR des *Pin1*-Genes auf RNA-Ebene.

Es wurde normale Mundschleimhaut mit HNSCC-Tumorgeweben und HNSCC-Zelllinien mittels qRT-PCR verglichen. Die Transkriptionslevels der *Pin1*-mRNA fielen in HNSCC-Geweben höher aus als in normaler Mundschleimhaut, und sind in HNSCC-Zelllinien am höchsten. Es sind drei bzw. fünf Ansätze gemittelt und mit ihrer Standardabweichung dargestellt.

So zeigt die Analyse der Genaktivität mittels qPCR ein entsprechendes Bild zu den Beobachtungen, die immunbiochemisch auf Proteinebene gemacht werden konnten. Die *Pin1*-Mengen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene sind in Tumorgewebe und -zelllinien erhöht und eine Erhöhung der *Pin1*-Proteinmenge geht mit einer vermehrten Transkription des *Pin1*-Gens einher.

4.3 Quantifizierung der *Pin1*-Western Blot-Signale und Korrelation mit klinischen Daten

Um einen eventuellen Zusammenhang zwischen der *Pin1*-Expression und klinischen Daten der jeweiligen HNSCC-Patienten herzustellen, wurden die immunbiochemisch erhaltenen *Pin1*-Signale mit einem digitalen Densitometrieanalyseprogramm (MCID Image System, ImagingResearch Inc. St. Catherines, Canada) ausgewertet, und zwei Gruppen zugeteilt: Niedriges Expressionslevel (+) und hohes Expressionslevel (+++). Dabei wurde die Gesamtfläche des *Pin1*-Signals bestimmt und auf das als interne Ladekontrolle vorhandene Aktinsignal normalisiert. Der Cut-Off wurde bei 50% der maximalen Signalfäche des gefundenen *Pin1*-Signales gesetzt. Alle Signale, die unter

dem Cut-Off lagen, galten als „niedriges Pin1-Expressionslevel (+)“, alle über dem Cut-Off als „hohes Pin1-Expressionslevel (+++)“. Die niedrig-exprimierende Patientengruppe (n=17) wurden dann mit der hoch-exprimierenden Gruppe (n=24) verglichen. Betrachtet wurden Patientenalter, Tumorstadium und Tumorgrading mithilfe des logrank-Test und des GraphPadPrism version 4.00 (GraphPad Software, San Diego). Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Es wurde versucht, einen Zusammenhang herzustellen zwischen den Patientendaten der einzelnen Tumorgewebe und den jeweiligen Expressionslevel des Pin1-Proteins. Es konnte allerdings keine Korrelation zwischen beispielsweise dem Alter der Patienten, dem histologischen Grading, oder dem Tumorstadium und dem jeweiligen Pin1-Proteinlevel hergestellt werden. Die untersuchten Tumorgewebe sind in der Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 13. Korrelation der Pin1-Expression mit klinischen Daten

	Pin1 +	Pin1 +++
Anzahl der Gewebe	17 (100%)	24 (100%)
Lokalisation des Primärtumors		
Larynx	7/17 (41%)	10/24 (42%)
Hypopharynx	4/17 (24%)	3/24 (17%)
Oropharynx	4/17 (24%)	6/24 (25%)
Mundhöhle	2/17 (12%)	3/24 (13%)
Nase	0/17 (0%)	1/24 (4%)
Grading		
G1	0/17 (0%)	3/24 (13%)
G2	13/17 (76%)	16/24 (67%)
> G2	4/17 (24%)	3/24 (13%)
TNM-Stadium		
T1	2/17 (12%)	3/24 (13%)
T2	10/17 (69%)	12/24 (50%)
T3-4	5/17 (29%)	9/24 (38%)
N0	4/17 (24%)	8/24 (33%)

N1	13/17 (76%)	14/24 (65%)
> N1	8/17 (47%)	10/24 (42%)
M0	17/17 (100%)	22/24 (96%)
M1	0/17 (0%)	1/24 (4%)
Durchschnittliches Erkrankungsalter (Jahre)	53	67
Geschlecht		
Männlich	14/17 (82%)	16/24 (67%)
Weiblich	3/17 (18%)	8/24 (33%)

Dargestellt sind in der linken Spalte die jeweiligen klinischen Parameter, anhand derer die Gewebe mit hoher Pin1-Expression (rechte Spalte) mit denen mit niedriger Expression (mittlere Spalte) verglichen wurden.

4.4 Untersuchungen zum Phosphorylierungszustand von Pin1

Pin1 wird über die Phosphorylierung am Serin 16-Rest seiner WW-Domäne in seiner Aktivität gehemmt. Um herauszufinden, ob das Pin1-Protein in HNSCC-Tumorzellen nicht nur überexprimiert, sondern vielleicht auch aktiver ist, wurde der Zustand der Phosphorylierung des Pin1-Proteins in Kopf-Hals-Karzinomzelllinien und -geweben näher betrachtet. Phosphorylierungen, als Addition einer sauren Gruppe, lassen sich an Proteinen durch die Veränderung ihres isoelektrischen Punktes feststellen. Der berechnete isoelektrische Punkt des Pin1-Proteins liegt bei pH 8,95 (www.phosphosite.org). Eine Phosphorylierung des Pin1-Proteins müsste in einer Verschiebung seines isoelektrischen Punktes in den sauren Bereich resultieren.

4.4.1 Ergebnisse aus der 2D-Gelelektrophorese

Um eine solche Verschiebung festzustellen, wurde eine zweidimensionale Gelelektrophorese mit Proteinextrakten aus Kopf-Hals-Karzinomgeweben und -zelllinien durchgeführt, immunbiochemisch auf Pin1 analysiert und mit den entsprechenden Ergebnissen aus Normalgeweben verglichen. Dabei ergab sich, dass bei Kopf-Hals-Tumorgeweben und -zelllinien Pin1 fast ausschließlich im Bereich der unphosphorylierten Form, bei dem kalkulierten pH 8,95 nachweisbar ist. Wie oben beschrieben entspricht die unphosphorylierte Form dem aktiven Zustand des Proteins.

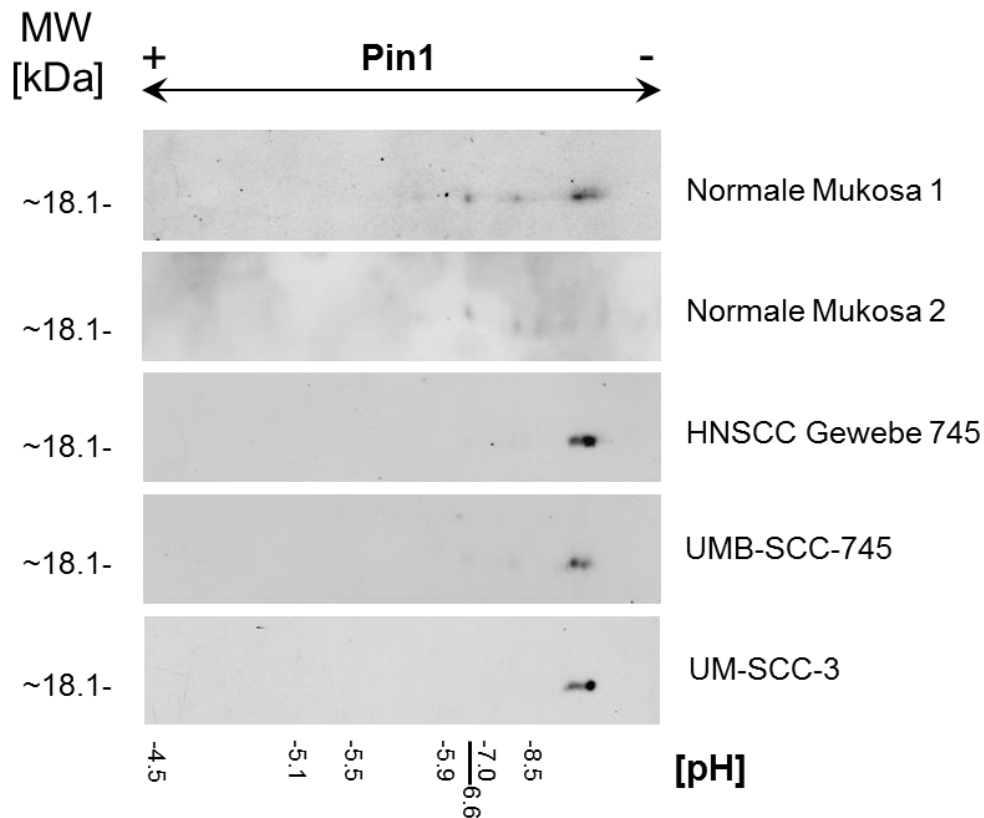


Abbildung 10. 2D-Gelelektrophorese von Mukosa verglichen mit HNSCC-Gewebe und -zelllinien. Die dargestellten Pin1-Formen migrieren in normaler Mundschleimhaut zum Großteil in saureren Bereichen als pH 8,5, während sie in sowohl HNSCC-Geweben als auch Zelllinien vor allem basischeren Bereich migrieren, was auf eine geringere Protein-Phosphorylierung hinweist.

In normaler Mukosa sind hingegen, wie der Abbildung 10 zu entnehmen ist, Pin1-Formen nachzuweisen, die bei saureren pH-Werten migrieren. Mittels immunbiochemischem Nachweis mit spezifischen Antikörpern konnten von Pin1 isoelektrische Formen gefunden werden, die bis etwa bei einem pH 6,8 migrieren, während die unphosphorylierte Form kaum nachweisbar ist. Diese pH-Verschiebung in den sauren pH-Bereich beruht vermutlich auf Phosphorylierung des Pin1-Proteins, wodurch es in seine inaktive Form überführt wurde. Die noch weiter im negativeren pH-Bereich liegenden Pin1-Phosphorylierungsformen könnten mehr als eine Phosphatgruppe enthalten. Hierbei ergibt sich eine berechnete pH-Verschiebung von Pin1 zu pH 7,97 (eine Phospho-Gruppe), pH 7,04 (zwei Phospho-Gruppen) und pH 6,61 (drei Phospho-Gruppen), ermittelt mit dem Vorhersageprogramm von phosphosite.org. Um näher festzustellen, ob tatsächlich eine Phosphatgruppe für die pH-Verschiebung von Pin1 in Tumorgeweben im Vergleich zu Normalgeweben verantwortlich sein kann, wurden die Lysate der Normalgewebe mit alkalischer Phosphatase behandelt, wodurch

Phosphatgruppen von den Proteinen im Lysat abgespalten werden. Die auf diese Weise behandelten Lysate zeigten anschließend nur die unphosphorylierte Pin1-Isoform bei pH-Bereich 8,95, bis auf eine Population bei ca. pH 6,6, die anscheinend resistent gegen alkalische Phosphatase ist.

4.4.2 Immunpräzipitation und Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Um das Ergebnis zu verifizieren wurden frisch gewonnene Lysate gesunder Mukosa zunächst mit Pin1-Antikörpern immunpräzipitiert wie in Abschnitt 3.1.3.3 beschrieben und anschließend mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und immunbiochemisch analysiert. Dabei wurden normale Mukosalysate, die mit alkalischer Phosphatase behandelt wurden, verglichen mit solchen, die keiner Phosphatasebehandlung ausgesetzt waren (Abb. 11). Die nativen Pin1-Immunpräzipitate aus der gesunden Mukosa migrierten in der Elektrophorese im saureren Bereich, die mit alkalischer Phosphatase behandelt worden waren, erbrachten im immunbiochemischen Nachweis überwiegend die unphosphorylierte Pin1-Form. In der normalen gesunden Mukosa scheint also der Großteil des Pin1 in ein- bis mehrfach phosphoryliertem und damit vermutlich inaktivierten Zustand vorzuliegen, während hingegen in Tumoren Pin1 unphosphoryliert in seiner aktiven Form überwiegt.

Interessanterweise fand sich bei einem pH von etwa 6,6 eine Gruppe von immunologisch reaktiven Pin1-Proteinen, welche gegen die Behandlung mit alkalischer Phosphatase resistent zu sein schien, was evtl. mit sterischer Hemmung der Alkalischen Phosphatase oder anderer posttranslationaler Modifikation des Pin1, wie einer bekannten Acetylierung an K46 (Choudhary et al., 2009), zusammenhängen könnte.

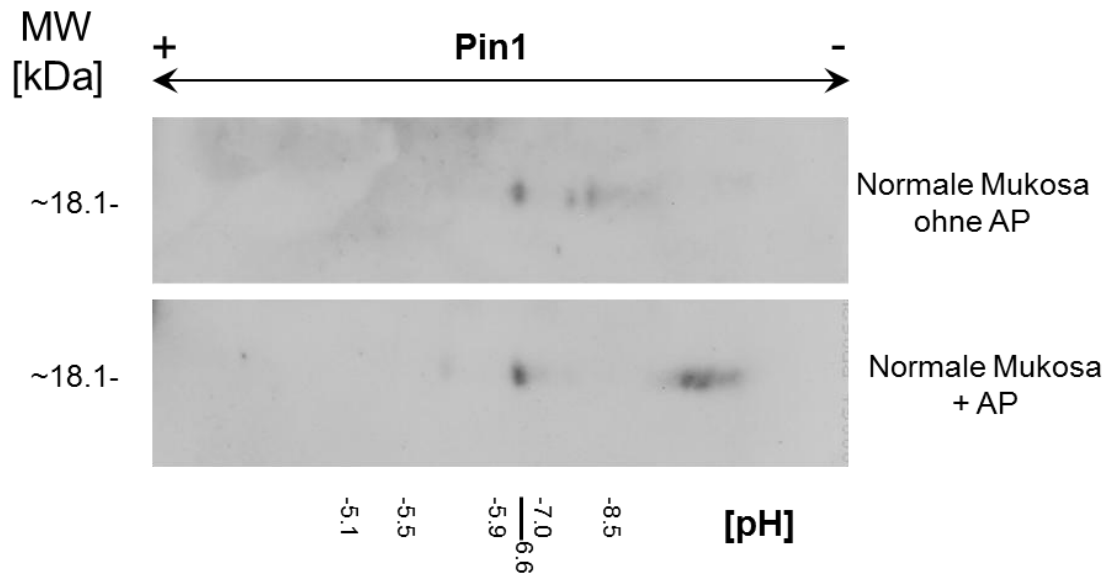


Abbildung 11. 2D-Gelelektrophorese von mit alkalischer Phosphatase behandelter Mukosa und unbehauelter Mukosa. Die immunbiochemische Analyse zeigt eine unterschiedliche Verteilung des Pin1-Proteins. Die mit alkalischer Phosphatase behandelten Lysate normaler Mukosa zeigten eine Verschiebung der Pin1-Proteine in den basischen Bereich (unten) im Vergleich zu dem unbehauelten Zelllysate (oben). Auffällig ist die Phosphatase-resistente Pin1-Form bei pH 6,6.

4.5 Mutationsanalyse

Um den Zustand der Hypophosphorylierung des Pin1-Proteins näher zu untersuchen, wurden die Sequenzen von Pin1 bestimmt. Zum Ausschluss von Mutationen im Pin1-Gen, die zu den Veränderungen im Phosphorylierungszustand des Proteins in Tumorzellen führen könnte, wurde in 11 HNSCC-Zelllinien (UM-SCC-1, -3, -4, -14A, -22B, -27, UMB-SCC-745, -864, -969, UT-SCC-24A, -26A, siehe Tabelle 8) eine Sequenzanalyse der cDNAs von Pin1 durchgeführt.

Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus den o.g. 11 Zelllinien mittels des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert, daraus cDNA durch Reverse Transkriptase synthetisiert und diese dann einer Amplifikation durch PCR unterzogen. Die erhaltenen Amplikons aus den 11 Zelllinien wurden zur Sequenzierung an ein kommerzielles Labor geschickt. Die ermittelten cDNA-Sequenzen wiesen allerdings in allen untersuchten Zelllinien keinerlei Mutationen auf, sondern entsprachen der in der Genbank (Accession #NM_006221.2, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) hinterlegten humanen Pin1-Sequenz der mRNA (siehe Anhang). Eine Mutation in der Kodierungssequenz ist also in den untersuchten Zelllinien nicht für die Überaktivierung der PPIase verantwortlich.

4.6 Ergebnisse der Pin1-Inhibitionsversuche

Es sollte nun untersucht werden, ob, und wenn ja welchen Einfluss eine Hemmung der Pin1-Aktivität auf HNSCC-Tumorzellen hat. Dies sollte einerseits durch die gezielte Hemmung von Pin1-Protein durch den natürlich vorkommenden Inhibitor Juglone erfolgen und andererseits durch die siRNA-vermittelte Hemmung (RNA-Interferenz) der Pin1-Expression.

4.6.1 Pin1-Hemmung mit Juglone

Juglone ist in der Lage, PPIasen vom Parvulin-Typ irreversibel zu inhibieren. Um den Effekt des natürlicherweise vorkommenden Pin1-Inhibitors Juglone auf Pin1 zu untersuchen, wurden Zellen der Linie UMB-SCC-745 mit 10 μ M Juglone für bis zu 6 Stunden inkubiert und der Anteil an toten Zellen durch Trypanblau-Färbung ermittelt. Wie Abbildung 12 zeigt, fällt der Anteil lebender Zellen bereits nach kurzer Inkubation mit Juglone drastisch ab, und sinkt kontinuierlich bis zu einem Wert von etwa 20% nach sechs Stunden.

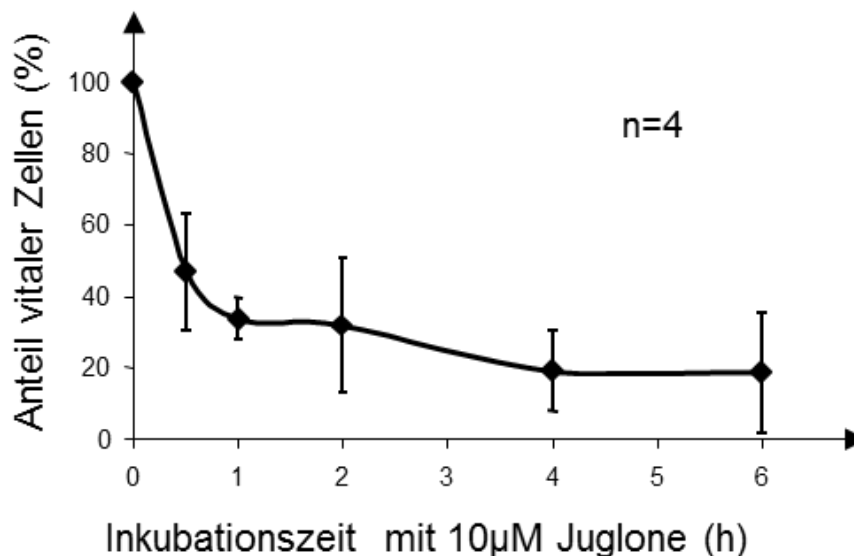


Abbildung 12. Abfall der vitalen Zellfraktion nach Inkubation mit dem Hemmstoff Juglone und Auszählung nach der Trypanblau-Ausschlussfärbung. Der Anteil vitaler Zellen fällt nach unterschiedlich langer Inkubation mit 10 μ M Juglone auf bis zu 20% nach 6 h ab.

Mittels FACS-Analyse wurde dieses Verhalten der Kulturzellen bei Inkubation mit Juglone näher analysiert. Hierbei zeigte sich, dass einerseits der Anteil toter oder apoptotischer Zellen mit fragmentierter DNA („sub-G1“) ebenfalls bis zu etwa 24% nach 120 Min ansteigt, während der Anteil sich teilender Zellen (G2/M) von etwa 10% (t = 0) auf 4% (t = 360 min) sinkt.

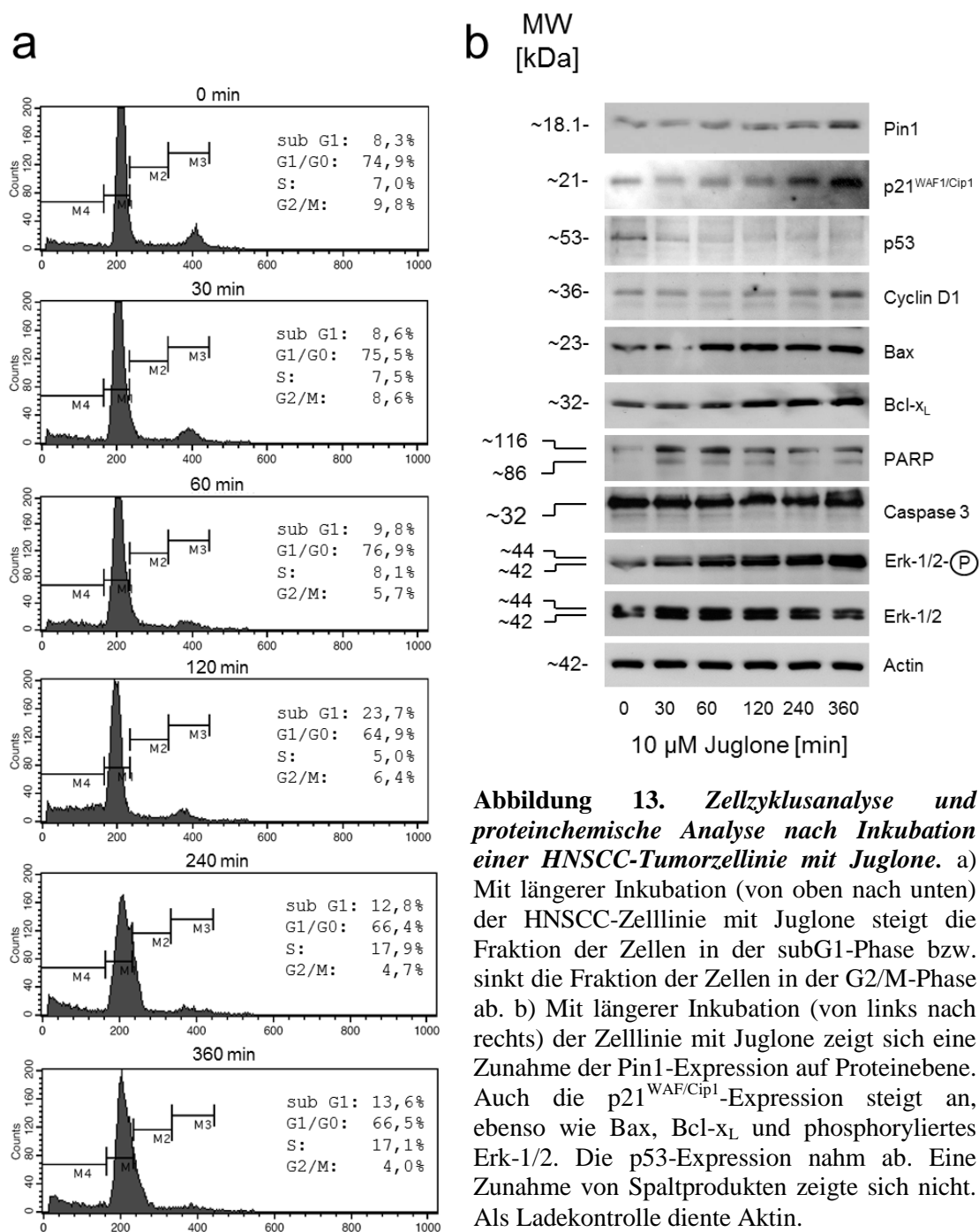


Abbildung 13. Zellzyklusanalyse und proteinchemische Analyse nach Inkubation einer HNSCC-Tumorzelllinie mit Juglone. a) Mit längerer Inkubation (von oben nach unten) der HNSCC-Zelllinie mit Juglone steigt die Fraktion der Zellen in der subG1-Phase bzw. sinkt die Fraktion der Zellen in der G2/M-Phase ab. b) Mit längerer Inkubation (von links nach rechts) der Zelllinie mit Juglone zeigt sich eine Zunahme der Pin1-Expression auf Proteinebene. Auch die p21^{WAF1/Cip1}-Expression steigt an, ebenso wie Bax, Bcl-x_L und phosphoryliertes Erk-1/2. Die p53-Expression nahm ab. Eine Zunahme von Spaltprodukten zeigte sich nicht. Als Ladekontrolle diente Actin.

Um die Abnahme der sich teilenden Zellen anhand von bestimmten Markerproteinen zu verfolgen, wurden die Zellen nach entsprechenden Inkubationszeiten mit Juglone lysiert und die Zellextrakte immunbiochemisch analysiert (siehe Abb. 13 b). Hierbei konnte man bei den behandelten Zellen einen Anstieg des Zellzyklus-Inhibitors p21^{WAF1/Cip1} bei t=240 Minuten und 360 Minuten nach Inkubation mit 10 μM Juglone nachweisen. Die Pin1-Expression erschien eher leicht ansteigend nach 6 Stunden Inkubationszeit mit dem Inhibitor. Dies könnte auf einer reaktiven Erhöhung der Expression nach Inhibition des Proteins beruhen. Ähnlich verhielt es sich mit Cyclin D1, Bax und Erk-1/2-phospho,

die ebenfalls nach 6 Stunden Inkubationszeit mit Juglone leicht anstiegen. PARP ließ 30 min nach Zugabe von Juglone erhöhte Expression erkennen, allerdings ohne jegliche Zeichen erhöhten Proteinabbaus und Spaltprodukten, welche normalerweise in fortgeschrittenen Stadium der Apoptose erkennbar sein müssten. Wie zu erwarten, sind sowohl Zellzyklus-inhibierende und pro-apoptotische Gene in den Juglone-behandelten Zellen stärker exprimiert.

4.6.2 Pin1-Hemmung mit siRNA

Um mögliche Nebeneffekte der Substanz Juglone, die sich nicht allein durch die Interaktion mit dem Pin1-Protein ergeben, auszuschließen, wurde die Pin1-Expression mittels einer spezifischen siRNA wie im Abschnitt 3.1.2.2 beschrieben, gehemmt. Zur methodischen Kontrolle wurden Kopf-Hals-Tumorzelllinien mit FITC-gekoppelter siRNA (siRNAFITC [sc-36869] der Firma Santa Cruz Biotechnology) transfiziert, wobei sich eine gut Transfektionsrate zeigen ließ.

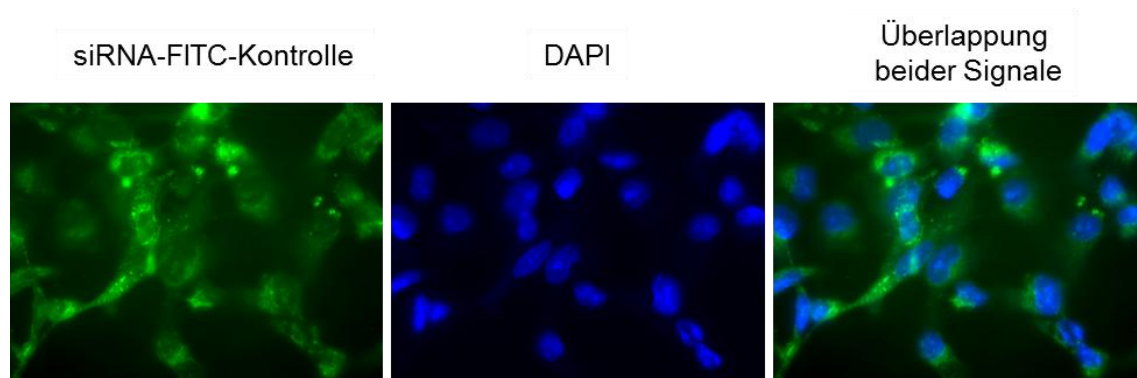


Abbildung 14. *Transfektion der HNSCC-Zelllinie mit FITC-gekoppelter Pin1-siRNA.* Das grüne Signal (FITC) lässt sich intrazytoplasmatisch in den transfizierten Zellen nachweisen, was auf eine hohe Transfektionseffizienz schließen lässt. (Vergrößerung 40fach.)

Weiterhin wurde eine qRT-PCR durchgeführt, um die Verminderung an Pin1-Transkripten nach der Inkubation der Zellen mit der spezifischen Pin1-siRNA zu kontrollieren (siehe Abbildung 15).

Die mit Pin1-spezifischer siRNA transfizierten Zellen wurden in der Durchflusszytometrie und ihre Zelllysate im Western Blot untersucht, jeweils im Vergleich zu mit „scrambled“ Kontroll-RNA transfizierten Zellen.

Immunbiochemisch konnte man eine deutliche Abnahme an Pin1-Protein in Zellen, die mit Pin1-siRNA inkubiert wurden, erkennen (Abbildung 16). Um die Unterschiede zwischen den siRNAs auszuschließen, wurden jeweils Kontroll- und Pin1-siRNA

unterschiedlicher Sequenzen von zwei unterschiedlichen Herstellern bezogen (siehe Tabelle 6).

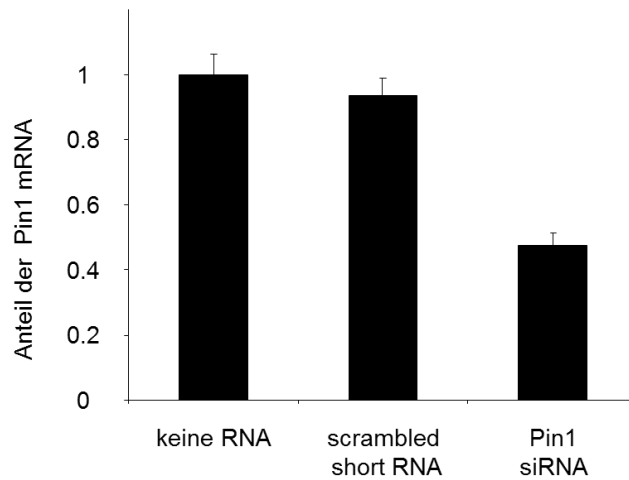


Abbildung 15. Abnahme der Pin1-RNA-Transkripte nach Inkubation von HNSCC-Zellen mit Pin1-siRNA.

Zu sehen ist ein deutlicher Abfall der Anzahl der Pin1-Transkripte in der qRT-PCR nach Inkubation der Zellen mit siRNA verglichen mit „scrambled“ RNA bzw. ohne siRNA als Kontrolle.

In der Abbildung 16 sind die Ergebnisse der FACS-Analyse und der Western Blots der durch siRNA transfizierte Zelllysate für die siRNA sc-36230 (Santa Cruz Biotechnology) in Abb. 16a und die der siRNA SI02662128: Hs_PIN1_5 HP Validated (Qiagen) in Abb. 16b aufgezeigt.

Die Hemmung der Pin1-Expression durch siRNA erbrachte ähnliche Ergebnisse wie auch die Hemmung durch den Inhibitor Juglone. Auch die Verminderung des Proteins durch den Einsatz von Pin1-siRNA sorgte dafür, dass die Zellfraktion in der FACS-Analyse in der G2/M-Phase von 5,44% auf 3,86% abnahm beziehungsweise von 12,90% auf 7,59%. Auch war nach Inhibition die Zellfraktion in der subG1-Phase in Pin1-siRNA transfizierten Zellen 49,64 % verglichen mit 11,91 % in den mit „scrambled“ RNA transfizierten Zellen. Jedoch zeigte sich ein derartiger Effekt des Zellsterbens nur in den Fällen, in denen die siRNA der Firma Qiagen (Abb. 16b) zur Anwendung kam.

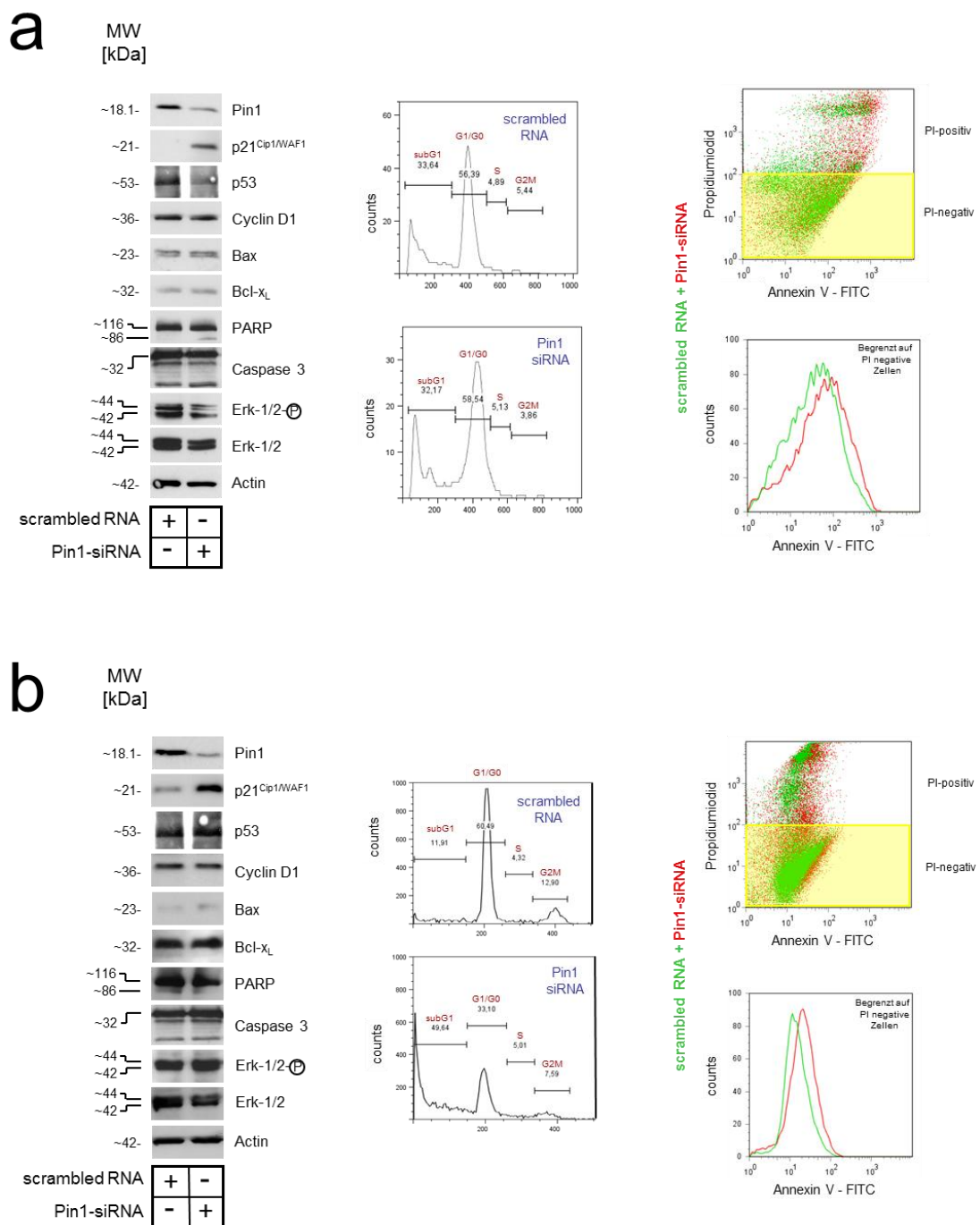


Abbildung 16. Ergebnisse der Pin1-Hemmung mittels siRNA in HNSCC-Zelllinien. Abgebildet sind im oberen Bildabschnitt (a) die Ergebnisse unter Verwendung der siRNA sc-36230 (Santa Cruz Biotechnology) und im unteren Bildabschnitt (b) die Ergebnisse bei Verwendung der siRNA SI02662128: Hs_PIN1_5 HP Validated (Qiagen). In der linken Spalte zeigt sich immunbiochemisch bei beiden siRNAs ein deutlicher Abfall von Pin1 auf Proteinebene nach Transfektion. p21^{WAF1/Cip1} steigt deutlich an. Die übrigen getesteten Proteine zeigten keine auffälligen Veränderungen. In der mittleren Spalte werden die durchflusszytometrisch gemessenen Verteilungen der Pin1-siRNA-transfizierten Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen mit durch „scrambled“ RNA transfizierten Zellen verglichen. Bei beiden Pin1-spezifischen siRNAs lässt sich hier ein Abfall der Zellfraktion in der G2/M-Phase verzeichnen. Eine Erhöhung der Pin1-siRNA-transfizierten Zellen in der subG1-Phase findet sich nur im Bildabschnitt (b). In der rechten Spalte werden die Annexin V-positiven

Signale der Propidiumjodid-negativen Zellen analysiert, um die Fraktion in Apoptose befindlicher Zellen zu ermitteln. Für beide siRNA ist nur eine sehr diskrete Erhöhung der AnnexinV-positiven Zellfraktion nachzuweisen.

Die anschließend durchgeführte Analyse einiger Markerproteine mittels Westernblot von Lysaten der mit Pin1-siRNA behandelten Zellen ließen wiederum einen deutlichen Anstieg von p21^{WAF1/Cip1} erkennen. Hingegen war keine wesentliche Änderung in der Expression von p53, Cyclin D1, Bax, Bcl-X_L, Phospho-Erk-1/2 oder Aktin zu verzeichnen (siehe linke Spalte der Abbildung 16).

Die mit siRNA behandelten Zellen wurden zudem noch mit FITC-gekoppeltem Annexin V gefärbt. Aus den durchflusszytometrisch gemessenen Signalen wurden die Propidiumjodid-positiven Zellsignale (Signale fragmentierter Zellen oder mit poröser Zellmembran) herausgefiltert. Unter den Propidiumjodid-negativen Signalen wurden die Annexin V-positiven (intakten, jedoch in Apoptose befindlichen) Zellen betrachtet. Verglichen mit den „scrambled“ RNA-behandelten Zellen zeigte sich jedoch in der Pin1-siRNA-behandelten Zellpopulation nur eine sehr geringe Erhöhung der Annexin V-Signale. Dies deutet somit nicht darauf hin, dass sich die auf diese Weise gehemmten Zellen in der Apoptose befanden. Dementsprechend fand sich im Westernblot auch keine Erhöhung der Caspase 3-Spaltprodukte oder von PARP im Lysat siRNA-gehemmter Zellen.

5 Diskussion

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches repräsentieren 3% der Prävalenz aller Malignome. Jährlich erkranken weltweit über 500.000 Menschen an dieser Krebserkrankung (Jemal et al., 2010), womit mit ihre Inzidenz weltweit an achter Stelle steht. Im Verlauf der Krankheit sterben nach 5 Jahren mehr als 50 % der Patienten (Ries, 2008.). Diese niedrige 5-Jahresüberlebensrate ist in den letzten 30 Jahren beinahe unverändert geblieben (Ragin et al., 2007). Tabak und Alkohol sind dabei immer noch die Hauptrisikofaktoren für die Krebsentstehung (Goldenberg et al., 2004). Doch auch orale Infektionen mit dem humanen Papillomavirus, vor allem mit den Serotypen 16 und 18, gelten als Risikofaktor für HNSCC-Tumore (Herrero et al., 2003), wobei es sich bei HPV-assoziierten Karzinomen typischerweise um Karzinome des Mundraumes handelt, welche in der Regel mit einer besseren Prognose assoziiert sind (Fakhry et al., 2008). Ca. 25% aller HNSCC-Tumore sind HPV-assoziiert, wobei HNSCCs des Mundraumes eine HPV-Assoziation von ca. 60% aufweisen. Die hiervon betroffenen Patienten zeichnen sich nicht immer durch typische Risikofaktoren, wie Nikotin- und Alkoholkonsum, aus. Dafür zeigt sich in dieser Gruppe ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit Ansteckung durch HP-Viren bei oralem Geschlechtsverkehr, analog zur Krebsentstehung bei HPV-assoziierten Zervixkarzinomen (D'Souza et al., 2009). Daher erklären sich der relative Inzidenzanstieg der HNSCC im Mundraum und im Tonsillenbereich und die relative Inzidenzabnahme von HNSCC in den übrigen Abschnitten des Kopf-Hals-Bereiches.

Die Behandlungsmethoden haben in den letzten Jahren nur für eine geringe Verbesserung der Prognose gesorgt. Die meisten Patienten können im frühen Stadium durch lokoregionäre Therapie geheilt werden. Leider präsentieren sich die meisten Patienten in fortgeschrittenen Stadien, in denen das 5-Jahresüberleben bei unter 50% liegt (Forastiere et al., 2006). Das Misslingen einer lokalen Kontrolle ist für eine Heilung der Patienten der häufigste limitierende Faktor. Die bisher zur Verfügung stehenden Behandlungen sind immer noch sehr strapaziös für die Patienten. Auf der Suche nach gezielten Therapiemöglichkeiten ist über die Tumorbilogie von Kopf-Hals-Karzinomen in den letzten Jahren viel geforscht worden. Gezielte Therapien z.B. in Form von gegen Tumorepitope gerichteten Antikörpern oder mittels kleiner Moleküle, die im Tumorzellstoffwechsel entregulierte Enzyme hemmen, sollen selektiv den gestörten Stoffwechsel von Tumorzellen attackieren, so dass der Tumor das

Wachstum einstellt (Workman, 2001). Für Kopf-Hals-Karzinome ist beispielsweise Cetuximab (Erbix[®]) zu nennen. Hierbei handelt es sich um einen chimären Antikörper gegen den EGF-Rezeptor, welcher zum Beispiel bei HNSCC-Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung eingesetzt werden kann (Bonner et al., 2006; Burtneß et al., 2005; Harari et al., 2009). Es ist daher von großer Wichtigkeit, weitere Zielproteine für die Therapie von HNSCC-Tumoren zu identifizieren.

Das Pin1-Protein ist diesbezüglich ein interessantes Kandidatenprotein, welches in zahlreichen Zellzyklusprozessen involviert ist und in vielen Tumoren überexprimiert vorliegt (Lu et al., 2006). Entdeckt wurde Pin1 1996 im Rahmen eines *yeast two-hybrid screens* auf der Suche nach Interaktionspartnern mit der NIMA-Kinase und wurde als die einzige bisherige PPIase identifiziert, die für die Funktion des Zellzyklus von essentieller Bedeutung ist (Lu et al., 1996). Das Pin1-Protein gehört zur Gruppe der PPIasen vom Parvulin-Typ und zeichnet sich durch seine einzigartige Substratspezifität aus. Pin1 erkennt eine Kernsequenz aus Aminosäuren bestehend aus phosphorylierten Serin- oder Threoninresten, welchen ein Prolin folgt (Ranganathan et al., 1997; Yaffe et al., 1997).

Strukturell verfügt es über eine sogenannte WW- und eine Isomerasedomäne, welche beide die Substratspezifität für eben genannte Sequenzen vermitteln (Lu et al., 1999). Dadurch arbeitet Pin1 eng mit zahlreichen Zellzykluskinasen, darunter JNKs, MAPKs zusammen. Im Verlauf dieser Signalwege kommt es dann meist zur Pin1-induzierten Stabilisierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie E2F, cJun, cFos, NFκB oder β-Catenin, so dass proliferationsfördernde Moleküle wie c-Myc oder Cyclin D1 vermehrt exprimiert werden (Ryo et al., 2003a; Ryo et al., 2002; Ryo et al., 2003b; Wulf et al., 2001). Die Substrate von Pin1 werden gegen die ubiquitinvermittelte Degradation im Proteasom geschützt oder auch der vermehrten Ubiquitinylierung zugeführt (Jentsch and Siepe, 2009; Liou et al., 2011; Siepe and Jentsch, 2009). Pin1-defiziente Mäuse, die durchaus lebensfähig sind, zeigen neben geringerem Körpergewicht, testicularer und renaler Atropie einige weitere interessante phänotypische Eigenheiten. Obwohl embryonale Fibroblasten aus Pin1^{-/-}-Tieren normal wachsen, weisen sie eine deutlich verminderte Fähigkeit zur Teilung als Antwort auf eine Serum-Stimulation nach einem G₀-Arrest auf (Fujimori et al., 1999). Ebenso ist die Brustentwicklung in der Schwangerschaft gestört, wobei die hier normalerweise auftretende massive Zellteilung

der Epithelzellen ausbleibt (Liou et al., 2002). Aus diesen Beobachtungen ließ sich ableiten, dass Pin1 für den Austritt einer Zelle aus der G₀-Phase zurück in den aktiven Zellzyklus eine wichtige Rolle spielt. Der Phänotyp der Pin1^{-/-}-Mäuse ähnelte dabei stark dem der Cyclin D1-knockout-Maus, so dass sich daraus die vielfältige Beeinflussung von Cyclin D1 durch Pin1 ablesen ließ. Auch ergab sich hier die enge Assoziation von Pin1 und β -Catenin, welche für HNSCC-Tumore gegenwärtig eher eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

Im Laufe der Jahre wurde Pin1 in zahlreichen menschlichen Tumoren überexprimiert vorgefunden, so dass davon auszugehen ist, dass sich dieses Protein als potentielles Zielmolekül für die Therapie zahlreicher Malignome eignen könnte. Außerdem scheint Pin1 an vielen anderen Stellen in der Onkogenese mitzuwirken. So scheint es beispielsweise auch bei der Invasivität von Tumoren eine Rolle zu spielen. In Prostatakarzinomzelllinien konnte eine Abnahme der TGF- β -vermittelten Invasivität nach Pin1-Inhibition beobachtet werden (Matsuura et al., 2010). Ferner wurde in letzter Zeit mehr über die Rolle von Pin1 bei der Entwicklung von Chemoresistenzen herausgefunden (Ding et al., 2007; Ding et al., 2008), so z.B. in Mammakarzinomzelllinien, in denen eine Tamoxifenresistenz in Mammakarzinomzelllinien durch eine Pin1-vermittelte Degradation von CDK10 vermehrt beobachtet wurde (Khanal et al., 2011).

Allerdings scheint Pin1 nicht ausschließlich über onkogenetische Eigenschaften zu verfügen (Theuerkorn et al., 2011). So scheint es im Bezug auf den Tumorsuppressor p53 auch durchaus der Onkogenese entgegenwirkende Vorgänge zu vermitteln, in dem es die Funktion und Stabilität von p53 und p73 fördert (Mantovani et al., 2004; Mantovani et al., 2007; Zacchi et al., 2002; Zheng et al., 2002). Allerdings fördert es die onkogenetischen Eigenschaften von mutiertem p53, welche in Tumoren häufig vorkommt (Girardini et al., 2011).

Trotz dieser Ambivalenz stellt Pin1 aufgrund seiner vielfach belegten Rolle in der Onkogenese ein potentielles Zielmolekül für die Tumorthherapie dar (Xu and Eitzkorn, 2009).

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung des Pin1-Proteins in HNSCC näher zu untersuchen. Es sollte hierbei untersucht werden, ob es in HNSCC eine ähnlich wichtige Rolle wie in anderen Karzinomen spielt und sich daher in der Folge eventuell als Zielprotein für solch gezielte Therapien eignen könnte. Um mehr über die Bedeutung

von Pin1 in HNSCC herauszufinden, wurde untersucht, ob Pin1 in HNSCC-Zelllinien und -geweben überexprimiert ist, ob es Hinweise auf Unterschiede im Phosphorylierungsstatus in Geweben und Zelllinien gibt, ob es mutiert ist und welche Konsequenzen sich aus einer Inhibition von Pin1 ergeben.

5.1 Überexpression von Pin1 in Tumoren

Da viele onkogene Signalwege existieren, in denen Pin1 involviert ist, interessiert die Frage, ob Pin1 in Tumoren durch eine Überexpression jene Signalwege vermehrt aktiviert. Tatsächlich konnte in Studien gezeigt werden, dass Pin1 in verschiedenen Tumoren überexprimiert wird. Bao et al. untersuchten 2004 immunhistochemisch die Überexpression von Pin1 in diversen menschlichen Tumorgeweben (Bao et al., 2004). Eine niedrige Pin1-Expression konnten in allen Geweben einschließlich der Normalgewebe gefunden werden. Verglichen mit den jeweiligen Normalgeweben überexprimierten 38 von 60 Tumorentitäten das Pin1-Protein. Darunter fanden sich besonders das Prostatakarzinom, Bronchialkarzinom, das Ovarial-, und das Zervixkarzinom. HNSCC-Tumore waren dabei im Untersuchungskollektiv nicht enthalten. Die erste Tumorart, in dem Pin1 als in der Mehrzahl überexprimiertes Protein identifiziert werden konnte, war das Mammakarzinom. Wulf et al. untersuchten 2001 Mammakarzinomgewebe auf ihre Pin1-Expression. Dabei zeigte sich eine verstärkte Expression des Proteins in mehr als 70% aller G2-Karzinome und in 90% der G3-Karzinome (Wulf et al., 2001). Pin1 war vermehrt nachweisbar in CyclinD1-überexprimierenden Mammakarzinomen in über 80% der untersuchten Fälle. Die Pin1-Proteinmenge war in CyclinD1-überexprimierenden Mammakarzinomen doppelt so hoch wie in Cyclin D1-negativen Mammakarzinomen.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von Pin1 in HNSCC-Geweben und Zelllinien im Vergleich zu normaler Mukosa zu untersuchen und auch zu quantifizieren, um festzustellen, ob auch in Kopf-Hals-Tumoren eine Überexpression von Pin1 stattfindet. Hierzu wurden Western Blots von Proteinisolaten aus 41 Geweben und 17 Zelllinien durchgeführt und auf die Expression von Pin1 untersucht. Hierbei zeigten sich erhöhte Expressionslevel von Pin1 sowohl in Karzinomgeweben als auch in HNSCC-Zelllinien im Vergleich zu normaler Schleimhaut des Kopf-Hals-Bereiches. Auf Proteinebene scheint somit auch in HNSCC-Tumoren eine Pin1-Überexpression vorzuliegen.

Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Arbeiten aus der Literatur. Bis zum Jahr 2003 war nur wenig über die Expression von Pin1 in HNSCC geforscht worden. Nachdem in anderen Tumoren eine Überexpression von Pin1 als recht häufiges Phänomen beobachtet wurde, untersuchten Miyashita et al 2002 immunhisto- und immunbiochemisch die Expression von Pin1 in 65 Kopf-Hals-Tumoren im Zusammenhang mit Cyclin D1, welches in HNSCC-Tumoren häufig überexprimiert wird. Dabei zeigte sich – wie auch in der vorliegenden Arbeit - eine Überexpression von Pin1 in den meisten der untersuchten HNSCC-Geweben (Miyashita et al., 2003a). Die Pin1-Überexpression korrelierte dabei auch mit der Cyclin D1-Expression. Zwischen der Expression von Pin1 und β -Catenin fand sich allerdings keine Korrelation. Während die Interaktion von Pin1 mit β -Catenin in Mammakarzinomzelllinien sehr wohl eine Bedeutung zu haben scheint (Ryo et al., 2001), ist diese in HNSCC-Tumoren nur wenig belegt.

Um näher zu untersuchen, ob die Überexpression des Pin1-Proteins auf die erhöhte Stabilität des Proteins zurückzuführen ist, oder mit vermehrter Transkription des Pin1-Gens zusammenhängt, wurden von denselben Tumorgeweben und –zelllinien quantitative PCR-Untersuchungen durchgeführt, wobei sich in beiden Untersuchungsmaterialien gegenüber normaler Mukosa erhöhte Pin1-Transkriptlevels zeigen ließen. Dementsprechend ist der erhöhte Pin1-Level in Tumorzelllinien und –geweben wahrscheinlich auf vermehrte Transkriptionsaktivität zurückzuführen. Dies legt nahe, dass stromaufwärts gelegene Fehlregulationen eine solche erhöhte transkriptionelle Aktivität hervorrufen, oder epigenetische Veränderungen eine Rolle spielen könnten. Evtl. greift auch in HNSCC-Geweben und –zelllinien der bekannte positive Feedback-Mechanismus über den Transkriptionsfaktor E2F, der die Transkription von Pin1 noch zusätzlich steigert. Wie in Abschnitt 1.4 beschrieben, ist Pin1 selbst ein Zielgen des Transkriptionsfaktor E2F (Ryo et al., 2002) und sorgt seinerseits über verschiedene Signalkaskaden für eine erhöhte E2F-Aktivität, so dass Pin1 dadurch seine eigene Transkription zusätzlich indirekt steigert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen somit nahe, dass die Überexpression von Pin1 in HNSCC-Tumoren ein häufig beobachtetes Phänomen ist. Die wurde auch von anderen Arbeitsgruppen in ähnlicher Weise festgestellt. Außerdem scheint für die Überexpression von Pin1 in HNSCC-Tumoren zumindest teilweise auch eine vermehrte Transkription des Pin1-Genes verantwortlich zu sein. Wie es zu dieser vermehrten

Transkription kommt, bleibt zu klären. Zudem könnten andere Faktoren eine erhöhte Stabilität des Pin1-Proteins bedingen, was ebenfalls zu der beobachteten Überexpression von Pin1 auf Proteinebene beitragen könnte. Auch die Beantwortung dieser Frage würde weitere Untersuchungen erfordern.

Im Zusammenhang mit einer Überexpression von Pin1 in Tumoren wurden bisher bereits in der Literatur verschiedene klinische Daten der jeweiligen Tumorpatienten näher betrachtet, um eine mögliche Rolle von Pin1 als prognostischer Marker zu untersuchen. Am besten gelang dies bei Mamma- und Prostatakarzinomen. In Mammakarzinomen fand sich eine positive Korrelation zwischen der immunbiochemisch nachgewiesenen Pin1-Expression und dem histopathologischen Grading des Tumorgewebes (Wulf et al., 2001). Ayala et al. fanden 2003 heraus, dass die Pin1-Expression in Prostatakarzinomen statistisch signifikant mit dem Tumorstadium korrelierte (Ayala et al., 2003). Außerdem stellte sich die Pin1-Expression als ein prognostischer Faktor für Krankheitsrezidive heraus. Das krankheitsfreie Überleben korrelierte negativ mit hoher Pin1-Expression. Bei der Voraussage von Rezidiven erwies sich die Pin1-Expression sogar als zuverlässiger als das histopathologische Grading, vor allem in der Gruppe niedrig differenzierter Karzinome (Ayala et al., 2003). In Lungentumoren konnten Tan et al. eine Assoziation von Pin1 überexprimierenden nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen mit einer schlechten Prognose der betroffenen Patienten belegen (Tan et al., 2010). Auch in weiteren Tumoren wurde nach statistischen Zusammenhängen zwischen Expression von Pin1 und klinischen Daten gesucht. In Kopf-Halskarzinomen versuchte das Miyashita et al. im Jahre 2002. Allerdings fanden sich keinerlei statistische Zusammenhänge zwischen der Pin1-Expression und klinischen Parametern wie Grading, Tumorstadium oder Lymphknotenstadium (Miyashita et al., 2003a). In der Folgestudie zeigte dieselbe Arbeitsgruppe eine Korrelation der Expression von Pin1-mRNA mit der von Cyclin D1-mRNA in 15 HNSCC-Geweben und fanden einen statistischen Zusammenhang zwischen der Höhe von Cyclin D1-Transkription und positivem Lymphknotenstatus (Miyashita et al., 2003b). Angesichts der sehr geringen Anzahl von Tumorgeweben, fällt jedoch eine zweifelsfreie Interpretation des statistischen Zusammenhangs schwer. In einer Arbeit von Leung et al. aus dem Jahr 2009 zeigte sich in 74 HNSCC-Tumorgeweben eine Korrelation der Höhe der Pin1-Expression mit der Überlebenszeit der Patienten vom Zeitpunkt der Operation an. Auch fand sich eine negative Korrelation

zwischen der Pin1-Expression und dem histopathologischen Grading (Leung et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls versucht, einen eventuellen statistischen Zusammenhang zwischen der Pin1-Expression in HNSCC-Tumorgewebe und verschiedenen klinischen Daten der jeweiligen Patienten, aus denen die Tumorgewebe stammten, zu untersuchen. Hierzu wurde das Gewebekollektiv in eine Gruppe niedrig Pin1-überexprimierender Tumorgewebe und eine Gruppe stark Pin1-überexprimierender Tumorgewebe aufgeteilt. Die beiden Gruppen wurden anhand von Alter und Geschlecht des Patienten, histopathologischem Grading und ihrem TNM-Stadium verglichen (siehe Tabelle 13). Hierbei ließen sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge ableiten. Dies könnte an der zu geringen Anzahl (insgesamt 41 Tumorgewebe) untersuchter Fälle liegen. Außerdem wurde in dieser Arbeit nicht zwischen HPV-assoziierten und nicht HPV-assoziierten HNSCC-Geweben unterschieden, da sich diese Tumortypen nach neueren Erkenntnissen unterschiedlich verhalten. Es wäre unter Umständen interessant, ob die Unterschiede in der Pin1-Expression auch mit dem jeweiligen HPV-Status des Gewebes zusammenhängen.

Insgesamt lässt sich sagen, dass eine Überexpression von Pin1 in Tumoren ein häufiges Phänomen darstellt, welches auch für die Mehrzahl der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches zuzutreffen scheint, wie diese Arbeit und die zitierten Arbeiten von Miyashita et al. nahelegen. Außerdem zeigte sich beispielweise, dass die sonst im Zellzyklus genau regulierte Pin1-Expression in Tumorzellen keinen zellzyklusbedingten Schwankungen mehr unterliegt (Shen et al., 1998). Die Tatsache, dass die Pin1-Expression durch den Transkriptionsfaktor E2F initiiert wird (Ryo et al., 2002) und dass in Tumoren der E2F/Rb-Signalweg häufig dereguliert ist, führt wohl in den Tumoren zur konstanten Überexpression von Pin1, welches seinerseits wiederum an vielen Stellen proliferationsfördernd wirkt, so dass die onkogenen Ereignisse auf andere Signaltransduktionskaskaden durch Pin1 übertragen werden können. Dass Pin1 im Allgemeinen häufig überexprimiert wird und zudem in einer vielfältigen Interaktion mit zahlreichen weiteren für die Onkogenese bedeutsamen Signalwegen steht, spricht dafür, dass Pin1 einen potentiellen Ansatzpunkt für neue Antitumorthapien darstellt.

5.2 Aktivierungsgrad von Pin1 in Tumoren

Nach der quantitativen Messung von Pin1 bezüglich der Überexpression in Tumoren stellt sich die Frage, ob sich Pin1 in Tumoren ebenfalls in seiner Qualität vom normalen Organismus unterscheidet. Pin1 als PPIase, die zahlreiche Zellzykluskinasen posttranslational durch Isomerisierung modifiziert, unterliegt selbst einer Regulation durch posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierung an Position 16 seiner Peptidkette. Ser16 liegt in der WW-Domäne von Pin1, welche die spezifische Bindung für die pSer/Thr-Pro-Sequenz seines Substrates vermittelt (Lu et al., 2002b). Wird Ser16 phosphoryliert, kann kein Substrat mehr gebunden und isomerisiert werden. In Ser16-phosphoryliertem Zustand ist Pin1 also deaktiviert. In der Arbeit von Wulf et al. wurde vermutet, dass Pin1 in Tumoren seltener in der phosphorylierten Form vorliegt (Wulf et al., 2001). Es wurde angenommen, dass die Zellzyklus-spezifischen Kinasen in Tumoren derart dereguliert sind, dass Pin1 zusätzlich zu seiner Überexpression auch noch überaktiviert ist.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, in wieweit Pin1 in Tumoren verglichen mit normaler Mukosa vermehrt unphosphoryliert vorliegt und somit in seiner Funktion und Substratbindung aktiv ist. Mittels 2D-Gelelektrophorese wurden verschiedene Pin1-Formen hinsichtlich ihres pI-Wertes aufgetrennt, wobei sich in normaler Mukosa im Gegensatz zu Tumorzellen stets zusätzlich zur Form, die bei ca. pH 8.95 (unphosphorylierte Form) migriert, noch eine weitere Form bei etwas saureren pH-Werten zeigte, die nach Behandlung mit Alkalischer Phosphatase verschwand (bis auf eine Form bei pH 6,1, die gegen eine Behandlung durch Alkalische Phosphatase resistent zu sein schien). Ursächlich hierfür sind womöglich eine oder mehrere dem Protein anhängende Phosphatgruppen in normaler Mukosa. Außerdem fanden sich in den untersuchten HNSCC-Tumorgeweben weniger der bei saurerem pH migrierenden Pin1-Formen verglichen mit normaler Mukosa. Diese Beobachtungen legen nahe, dass Pin1 in normaler Mukosa zumeist in phosphorylierter Form vorliegt, während es in HNSCC-Tumoren vermehrt unphosphoryliert ist. In Zusammenschau mit den Kenntnissen über die Hemmung von Pin1 durch Phosphorylierung am Ser16-Rest lässt sich somit vermuten, dass Pin1 in gesunder Mukosa überwiegend in seiner inaktiven Form vorkommt, während es in HNSCC-Tumoren wahrscheinlich überwiegend aktiviert erscheint.

Die Effekte, die in der Dephosphorylierung von Pin1 resultieren, sind unbekannt. Mutationen innerhalb der Pin1 kodierenden Sequenz, die das Pin1-Protein

überaktivieren oder gegen Abbau stabilisieren, wären ein denkbarer Mechanismus für die Überfunktion von Pin1 in Tumoren. In dieser Arbeit konnten jedoch in 11 HNSCC-Tumorzelllinien keinerlei Mutationen gefunden werden. In der Pin1-Sequenz sind bislang auch keinerlei Mutationen beschrieben worden. Allerdings wurden mehrere single nucleotide polymorphisms (SNPs) in der Pin1-Promotorregion in verschiedenen Studien untersucht (Lu et al., 2009). Diese konnten zwar nicht als Ursache für die verminderte Phosphorylierung des Pin1-Proteins identifiziert werden, jedoch zeigten sich interessante Zusammenhänge mit der Prävalenz von HNSCC. In der Arbeit von Lu et al. aus dem Jahr 2009 wurde in HNSCC-Patienten die Prävalenz verschiedener SNPs der Promotorregion des Pin1-Genes mit Kontrollpatienten verglichen. Dabei zeigte sich, dass der SNP-842G>C mit einem erniedrigten Risiko für HNSCC assoziiert war. Im Gegenzug konnte auf molekularer Ebene eine verminderte Promotoraktivität für jenen SNP gezeigt werden, so dass davon auszugehen ist, dass bei diesem SNP die transkriptionelle Aktivität und somit auch die Pin1-Expression vermindert ist (Lu et al., 2009). Allerdings wurden diese Vermutungen bisher nicht z.B. durch qRT-PCR verifiziert. Untersuchungen zu SNPs innerhalb des Pin1-Gens selbst, die darauf abzielten, diese mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs zu korrelieren, konnten keine Assoziation feststellen (Naidu et al., 2011).

Mutationen in der Pin1-Sequenz oder übergeordneten Genabschnitten, die zu einer Veränderung der Pin1-Aktivität führen, sind nicht bekannt. Über die Ursachen der Hypophosphorylierung von Pin1 müssten weitere Betrachtungen der in Tumoren deregulierten Vorgänge, an denen Kinasen stromaufwärts von Pin1 beteiligt sind, angeschlossen werden.

5.3 Effekte der Pin1-Inhibition

Frühere Versuche zeigten, dass Pin1-depletierte Hefezellen in der Mitosephase verharrten, was darauf schließen ließ, dass Pin1 für den korrekten Ablauf der Mitose benötigt wird (Lu et al., 1996). In derselben Arbeit wurde in HeLa-Zellen, die mit anti-sense-Pin1 bzw. mit Hämagglutinin-markierter cDNA von Pin1 transfiziert waren, in vitro gezeigt, dass die Pin1-Depletion in einer verstärkten Anreicherung der Zellen in der Mitosephase, bzw. die Überexpression von Pin1 in einem Arrest der Zellen in der G2- Phase resultierte (Lu et al., 1996). Somit wurde im Verlauf der Entdeckung der PPIase Pin1 ein deutlicher Effekt nach Pin1-Hemmung durch genetischen *knock-out* klar.

Einen natürlich vorkommenden Hemmstoff von Pin1 stellt die aus dem Walnussbaum stammende Substanz Juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) dar. Juglone hemmt irreversibel die enzymatische Aktivität von Pin1, in dem es einen Cysteinrest in seinem aktiven Zentrum inaktiviert (Hennig et al., 1998). Es wurden mehrere in vitro-Experimente mit Juglone durchgeführt (Chao et al., 2001; Rippmann et al., 2000), wobei gezeigt werden konnte, dass eine Inhibition von Pin1 – ähnlich den Effekten einer Pin1-Depletion – in einem Zellzyklusarrest mündete.

Rippmann et al untersuchten 2000 die Effekte einer Hemmung von Pin1 in vitro an Zelllinien: Expression von Pin1-antisense-RNA, Expression dominant negativen Pin1-Proteins und Hemmung des Pin1-Proteins durch Juglone. In allen drei Ansätzen konnte zytologisch beziehungsweise durch Zellzyklusanalyse eine erhöhte Apoptoserate beobachtet werden. Insbesondere zeigte sich für Juglone eine dosisabhängige Steigerung des Effekts (Rippmann et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte der Pin1-Inhibition sowohl durch den Hemmstoff Juglone als auch durch Pin1-spezifische siRNA untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass eine Inkubation von HNSCC-Zelllinien mit Juglone ebenfalls vermehrt zum Zelltod führte. Es zeigte sich sowohl mittels Trypanblau-Ausschlussfärbung ein Anstieg der toten Zellfraktion nach Inkubation mit Juglone als auch eine vermehrte Anreicherung der inkubierten Zellen in der subG1-Phase in der Durchflusszytometrie mittels Propidiumjodidfärbung. Immunbiochemisch ließ sich zwar ein Anstieg proapoptotischer und zellzyklusinhibierender Proteine, jedoch keine Zunahme von Caspase-Spaltprodukten in den inkubierten Zellen zeigen. Somit war es nicht eindeutig zu beweisen, dass der Apoptosemechanismus, der von Rippmann et al. beobachtet worden war, auch im vorliegenden Experiment für das Zellsterben verantwortlich ist. Allerdings handelt es sich bei Juglone nicht, wie zunächst angenommen, um einen hundertprozentig spezifischen Pin1-Inhibitor. Die Hemmung von Pin1, wie Chao et al. 2001 zeigen konnte, ist nicht die einzige Wirkung von Juglone. Es konnte gezeigt werden, dass Juglone auch Pin1-unabhängige Effekte in der Zelle durch direkte Hemmung der RNA-Polymerase II entfaltet und somit die Transkription verhindert (Chao et al., 2001).

Neuere Ergebnisse zeigen zudem, dass die Hemmung von Pin1 durch Juglone in Zellkulturen einen zu dem Chemotherapeutikum Etoposid additiven zytotoxischen Effekt erzielen kann, sofern die Etoposidgabe vor der Juglonegabe erfolgt (Mathur et

al., 2011). Man geht davon aus, dass die Hemmung der durch Pin1 regulierten DNA-Reparaturmechanismen den zytotoxischen Effekt forciert. In dem Chemotherapeutikum 5'-Nitroindirubinoxim fand sich im letzten Jahr eine neue Substanz, die über eine Hemmung von Pin1 und der *polo-like kinase 1 (Plk1)* in Bronchialkarzinomzelllinien die Proliferation hemmte und apoptotische Effekte steigerte (Yoon et al., 2012).

Durch die Inhibition mittels siRNA erbot sich in der vorliegenden Arbeit eine Möglichkeit, Pin1 auf Transkriptebene, ohne die Gefahr Pin1-unabhängiger Effekte innerhalb der Zelle zu provozieren, selektiv herunter zu regulieren. Hier ließ sich durchflusszytometrisch beobachten, dass die Inhibition von Pin1 durch zwei verschiedene siRNAs zu einer Abnahme der Zellfraktion in der G2 / M-Phase führte, und zu einer Zunahme der Zellen in der subG1-Phase, jedoch nur bei Anwendung einer der beiden siRNAs. Allerdings konnte nach einer Hemmung von Pin1 durch Pin1-spezifische siRNA nur eine sehr diskrete Verstärkung des AnnexinV-Signales in Propidiumiodid-negativen Zellen nachgewiesen werden. Dementsprechend konnte auf Proteinebene in HNSCC-Zelllinien keine Vermehrung apoptosespezifischer Proteine wie Proteinspaltprodukte und PARP nachgewiesen werden, so dass ein eindeutiger apoptotischer Effekt nicht zu erkennen war. Die Apoptose scheint in HNSCC-Zellen durch eine Pin1-Hemmung also nicht vermittelt zu werden. Möglicherweise war die Hemmung nicht stark genug. Eventuell verfügen HNSCC-Zellen im Gegensatz zu den bisher untersuchten Zellen in der Literatur, die vermehrte Apoptose nach Pin1-Inhibition aufwiesen, über bestimmte Eigenschaften, um die Apoptose nach Pin1-Inhibition zu umgehen. Die Klärung dieser Frage wird weiterführende Experimente erfordern.

5.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Pin1 in den meisten Kopf-Hals-Karzinomen eine wichtige Rolle spielt. Es wird überexprimiert, seine Transkription scheint dereguliert. Das Protein selbst ist ebenfalls aktiviert, also zumeist dephosphoryliert, was sich in den Experimenten zum Phosphorylierungszustand zeigen ließ. Die Versuche der Inhibition von Pin1 zeigen, dass die Zellen ihr Wachstum einstellen und sogar vermehrt in Apoptose übergehen. Pin1 ist ein gut untersuchtes Protein mit einer gut definierten Substratspezifität, welches die Funktion vieler in der Onkogenese wichtiger Regulationswege beeinflusst.

Insgesamt lässt sich sagen, dass Pin1 wie in zahlreichen anderen Malignomen beobachtet ebenfalls stark in die Onkogenese von HNSCC-Tumoren involviert ist und

sich daher als potentiell Ziel für die Krebstherapie eignen könnte (Xu and Etkorn, 2009; Yeh and Means, 2007).

Allerdings ist es notwendig weitere Experimente anzuschließen, um klinisch anwendbare Inhibitoren zu entwickeln. Es müsste auch mehr über die Vorgänge stromaufwärts von Pin1, die Gründe der Pin1-Deregulierung herausgefunden werden. Die Ursache, warum Pin1 hypophosphoryliert ist und warum es nicht vermehrt abgebaut wird, ist bisher relativ unerforscht. Juglone weist als Pin1-Inhibitor einige Unspezifitäten auf, die geklärt werden müssten, und weiterhin bleibt herauszufinden, ob eine medikamentöse Pin1-Inhibition in Versuchsorganismen einen therapeutisch nutzbaren antitumorösen Effekt erzielen kann.

6 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (HNSCC) stellen die Tumorentität mit der achthäufigsten Inzidenz weltweit dar. Dabei ist die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate unter 50%. Die lokoregionäre Kontrolle ist dabei das entscheidende Behandlungsziel. Leider präsentiert sich ein Großteil der Erkrankten in fortgeschrittenen Stadien, die durch chemo- bzw. strahlentherapeutische Maßnahmen angegangen werden müssen. Um die bisher begrenzte Auswahl an gezielt gegen Tumoren gerichteten Therapeutika zu erweitern, ist es notwendig in Kopf-Hals-Tumorgewebe neue Zielproteine zu identifizieren, die im gestörten Zellstoffwechsel der Tumore eine Rolle spielen.

Pin1 ist eine Peptidyl-Prolyl-Isomerase (PPIase) aus der Familie der Parvuline. Sie zeichnet sich durch eine unter PPIasen einzigartige Substratspezifität für phosphorylierte Ser/Thr-Pro-Sequenzen aus. Aufgrund dieser Substratspezifität arbeitet sie eng mit verschiedenen Zellzykluskinasen, die in der Onkogenese eine Rolle spielen, zusammen. Sie ist die bisher einzige Isomerase, die für einen korrekten Ablauf des Zellzyklus unabdingbar ist. In vielen Tumoren wurde Pin1 überexprimiert vorgefunden. In manchen Tumoren liegt es zudem als überwiegend unphosphorylierte Form vor, wobei die unphosphorylierte Form des Pin1-Proteins wahrscheinlich die aktive Form darstellt.

Mittels Immunhistochemie, Immunzytochemie, Immunbiochemie und quantitativer PCR wurde der Expressionsstatus von Pin1 in 17 HNSCC-Tumorzelllinien und 41 HNSCC-Tumorgewebe untersucht und mit normaler Kontrollschleimhaut verglichen. Weiterhin konnten isoelektrische Varianten des Pin1-Proteins in der 2D-Gel-Analyse beobachtet werden. So konnte der Phosphorylierungszustand von Pin1 in Tumorgewebe und Normalgewebe verglichen werden. Schließlich wurden die Konsequenzen einer Pin1-Hemmung durch den natürlich vorkommenden Pin1-Inhibitor Juglone sowie durch Pin1-spezifische siRNA mittels FACS-Analyse untersucht.

Pin1 wurde in den untersuchten Tumorgewebe und -zelllinien stärker exprimiert als in den Normalgewebe. Auch war Pin1 in den Tumorgewebe verglichen mit Normalgewebe hypophosphoryliert, was vereinbar ist mit einer Überaktivierung des Proteins. Eine Hemmung von Pin1 führte in den untersuchten Zelllinien sowohl nach

Behandlung mit Juglone als auch nach Transfektion mit Pin1-siRNA zu einer Erhöhung der Fraktion toter Zellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Pin1 auch in Kopf-Hals-Karzinomen eine Rolle bei der Tumorentstehung spielt. Es ist überexprimiert und liegt anscheinend vermehrt in seiner aktiven Form vor. Allerdings konnte kein statistischer Zusammenhang zwischen den klinischen Daten der Patienten, von denen die Tumorgewebe stammten, und dem jeweiligen Pin1-Expressionsgrad gezeigt werden. Warum Pin1 in Tumorgeweben meist in dephosphoryliertem Zustand vorliegt, muss in weiterführenden Studien noch näher untersucht werden. Eine vermehrte Apoptoserate nach Pin1-Hemmung durch den natürlich vorkommenden Pin1-Inhibitor Juglone als auch durch Pin1-spezifische siRNA konnte nicht beobachtet werden, allerdings zeigte sich ein Anstieg der Tumorzellfraktion in der sub-G1-Phase des Zellzyklus.

Welche Faktoren den Phosphorylierungszustand von Pin1 beeinflussen, bleibt herauszufinden. Welche Signalkaskaden Pin1 ersetzen können, so dass die Tumorzelle trotz Pin1-Hemmung überleben kann, wäre Thema für weitere Forschung. Schließlich sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um den potentiellen Stellenwert von Pin1 als neuen therapeutischen Angriffspunkt bei der Behandlung von HNSCC-Tumoren zu beurteilen.

7 Summary

Squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC) represent world-wide the eighth most common tumor entity. The 5-year-survival-rate for all tumor stages collectively is below 50%. Loco-regional control is the central aim for the treatment of this disease. Unfortunately most patients are diagnosed at advanced disease stages and have to be treated with chemo- and radiation therapy. In order to improve disease outcome of HNSCC patients it is essential to discover new target proteins embedded in oncogenesis that could possibly be treated by novel therapeutics.

Pin1 is a peptidyl-prolyl isomerase (PPIase) belonging to the subfamily of the so-called parvulines. It is characterized by its unique substrate specificity, binding exclusively phosphorylated Ser/Thr-Pro residues. Because of its high substrate specificity Pin1 is linked to many cell cycle kinases that play a major role in oncogenesis. Pin1 is the only PPIase being essential for cell cycle function. It was found to be overexpressed in many human tumors, some of them expressing the unphosphorylated probably active form of the protein.

Expression status of Pin1 at the protein and mRNA were assessed by western blot analyses, immunohistochemistry, immunocytochemistry and quantitative RT-PCR in 17 HNSCC cell lines and 41 HNSCC tissues-samples. The results were compared to normal mucosa of the oral cavity as a control. Isoelectric variants of Pin1 were observed after isoelectric focussing and 2D gel electrophoresis. Thus, the phosphorylation status of the PPIase could be defined in tumor tissues and compared to normal tissues. Furthermore, the effect of Pin1 inhibition with its naturally existing inhibitor Juglone as well as with Pin1-specific siRNA was examined by FACS analysis.

In the analyzed HNSCC tumor tissues and cell lines Pin1 expression levels were found upregulated compared to normal control tissue samples. In addition, Pin1 was found hypophosphorylated and thus probably overactivated in tumor tissues in comparison to normal mucosa. Inhibition of Pin1 via juglone and via Pin1- specific siRNA showed increase in dead cells at cell cycle analysis.

The results point to Pin1 as a key-player in carcinogenesis of head and neck squamous cell cancer. The PPIase was found overexpressed and is present typically in its active unphosphorylated form. However, no significant correlation between Pin1 expression levels and clinical data could be found. It still has to be investigated why Pin1 is

frequently dephosphorylated in HNSCC tissues. No obvious increase of programmed cell death has been found in HNSCC cells following Pin1 inhibition with juglone and transfection with Pin1-specific siRNA but the fraction of cells in the sub-G1 phase of the cell cycle was increased.

It will be a subject of further studies to discover what mechanisms lead to reduced Pin1 phosphorylation in tumor cells and which pathways could replace inhibited Pin1 function in a tumor cells in order to avoid apoptosis. Moreover, further exploration is necessary to define the role of Pin1 as a useful target for HNSCC therapy.

8 Literaturverzeichnis

1. Argiris, A., Brockstein, B., Haraf, D., Stenson, K., Mittal, B., Kies, M., Rosen, F., Jovanovic, B., and Vokes, E. (2004). Competing causes of death and second primary tumors in patients with locoregionally advanced head and neck cancer treated with chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 10, 1956-1962.
2. Argiris, A., and Karamouzis, M. (2010). Empowering induction therapy for locally advanced head and neck cancer. *Ann Oncol*.
3. Ayala, G., Wang, D., Wulf, G., Frolov, A., Li, R., Sowadski, J., Wheeler, T.M., Lu, K.P., and Bao, L. (2003). The prolyl isomerase Pin1 is a novel prognostic marker in human prostate cancer. *Cancer Res* 63, 6244-6251.
4. Bao, L., Kimzey, A., Sauter, G., Sowadski, J.M., Lu, K.P., and Wang, D.G. (2004). Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers. *Am J Pathol* 164, 1727-1737.
5. Blot, W., McLaughlin, J., Winn, D., Austin, D., Greenberg, R., Preston-Martin, S., Bernstein, L., Schoenberg, J., Stemhagen, A., and Fraumeni, J.J. (1988). Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 48, 3282-3287.
6. Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355-365.
7. Bonner, J.A., Harari, P.M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D.M., Cohen, R.B., Jones, C.U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., et al. (2006). Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354, 567-578.
8. Burtneß, B., Goldwasser, M.A., Flood, W., Mattar, B., Forastiere, A.A., and Group, E.C.O. (2005). Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 23, 8646-8654.
9. Chao, S.H., Greenleaf, A.L., and Price, D.H. (2001). Juglone, an inhibitor of the peptidyl-prolyl isomerase Pin1, also directly blocks transcription. *Nucleic Acids Res* 29, 767-773.

10. Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., and Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325, 834-840.
11. Curado, M., and Hashibe, M. (2009). Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 21, 194-200.
12. D'Souza, G., Agrawal, Y., Halpern, J., Bodison, S., and Gillison, M.L. (2009). Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis* 199, 1263-1269.
13. D'Souza, G., Kreimer, A., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W., Westra, W., and Gillison, M. (2007). Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 356, 1944-1956.
14. Ding, Q., He, X., Hsu, J.M., Xia, W., Chen, C.T., Li, L.Y., Lee, D.F., Liu, J.C., Zhong, Q., Wang, X., et al. (2007). Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. *Mol Cell Biol* 27, 4006-4017.
15. Ding, Q., Huo, L., Yang, J.Y., Xia, W., Wei, Y., Liao, Y., Chang, C.J., Yang, Y., Lai, C.C., Lee, D.F., et al. (2008). Down-regulation of myeloid cell leukemia-1 through inhibiting Erk/Pin 1 pathway by sorafenib facilitates chemosensitization in breast cancer. *Cancer Res* 68, 6109-6117.
16. Dougherty, M.K., Müller, J., Ritt, D.A., Zhou, M., Zhou, X.Z., Copeland, T.D., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Lu, K.P., and Morrison, D.K. (2005). Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell* 17, 215-224.
17. Fakhry, C., Westra, W.H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J.A., Pinto, H., Forastiere, A., and Gillison, M.L. (2008). Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 100, 261-269.
18. Forastiere, A.A., Trotti, A., Pfister, D.G., and Grandis, J.R. (2006). Head and neck cancer: recent advances and new standards of care. *J Clin Oncol* 24, 2603-2605.
19. Fujimori, F., Takahashi, K., Uchida, C., and Uchida, T. (1999). Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G(0) arrest. *Biochem Biophys Res Commun* 265, 658-663.
20. Furness, S., Glenney, A.M., Worthington, H.V., Pavitt, S., Oliver, R., Clarkson, J.E., Macluskey, M., Chan, K.K., Conway, D.I., and Panel, C.E. (2010).

- Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006386.
21. Girardini, J.E., Napoli, M., Piazza, S., Rustighi, A., Marotta, C., Radaelli, E., Capaci, V., Jordan, L., Quinlan, P., Thompson, A., et al. (2011). A Pin1/mutant p53 axis promotes aggressiveness in breast cancer. *Cancer Cell* 20, 79-91.
 22. Goldenberg, D., Lee, J., Koch, W.M., Kim, M.M., Trink, B., Sidransky, D., and Moon, C.S. (2004). Habitual risk factors for head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 131, 986-993.
 23. Göthel, S.F., and Marahiel, M.A. (1999). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci* 55, 423-436.
 24. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
 25. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
 26. Hanna, E., Alexiou, M., Morgan, J., Badley, J., Maddox, A.M., Penagaricano, J., Fan, C.Y., Breau, R., and Suen, J. (2004a). Intensive chemoradiotherapy as a primary treatment for organ preservation in patients with advanced cancer of the head and neck: efficacy, toxic effects, and limitations. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130, 861-867.
 27. Hanna, E., Sherman, A., Cash, D., Adams, D., Vural, E., Fan, C.Y., and Suen, J.Y. (2004b). Quality of life for patients following total laryngectomy vs chemoradiation for laryngeal preservation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130, 875-879.
 28. Harari, P.M., Wheeler, D.L., and Grandis, J.R. (2009). Molecular target approaches in head and neck cancer: epidermal growth factor receptor and beyond. *Semin Radiat Oncol* 19, 63-68.
 29. Hennig, L., Christner, C., Kipping, M., Schelbert, B., Rücknagel, K.P., Grabley, S., Küllertz, G., and Fischer, G. (1998). Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerases by juglone. *Biochemistry* 37, 5953-5960.
 30. Herrero, R., Castellsagué, X., Pawlita, M., Lissowska, J., Kee, F., Balaram, P., Rajkumar, T., Sridhar, H., Rose, B., Pintos, J., et al. (2003). Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 95, 1772-1783.
 31. Hunter, T. (1998). Prolyl isomerases and nuclear function. *Cell* 92, 141-143.

32. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60, 277-300.
33. Jentsch, S., and Siepe, D. (2009). Pin1, a novel switch in the ubiquitin pathway. *Cell Cycle* 8, 3800-3801.
34. Khanal, P., Yun, H.J., Lim, S.C., Ahn, S.G., Yoon, H.E., Kang, K.W., Hong, R., and Choi, H.S. (2011). Prolyl isomerase Pin1 facilitates ubiquitin-mediated degradation of cyclin-dependent kinase 10 to induce tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Oncogene*.
35. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
36. Lang, K., Schmid, F.X., and Fischer, G. (1987). Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* 329, 268-270.
37. Lee, T.H., Pastorino, L., and Lu, K.P. (2011). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Pin1 in ageing, cancer and Alzheimer disease. *Expert Rev Mol Med* 13, e21.
38. Leung, K.W., Tsai, C.H., Hsiao, M., Tseng, C.J., Ger, L.P., Lee, K.H., and Lu, P.J. (2009). Pin1 overexpression is associated with poor differentiation and survival in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 21, 1097-1104.
39. Liou, Y.C., Ryo, A., Huang, H.K., Lu, P.J., Bronson, R., Fujimori, F., Uchida, T., Hunter, T., and Lu, K.P. (2002). Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling cyclin D1-null phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1335-1340.
40. Liou, Y.C., Sun, A., Ryo, A., Zhou, X.Z., Yu, Z.X., Huang, H.K., Uchida, T., Bronson, R., Bing, G., Li, X., et al. (2003). Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature* 424, 556-561.
41. Liou, Y.C., Zhou, X.Z., and Lu, K.P. (2011). Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins. *Trends Biochem Sci* 36, 501-514.
42. Lippman, S., and Hong, W. (1989). Second malignant tumors in head and neck squamous cell carcinoma: the overshadowing threat for patients with early-stage disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 17, 691-694.
43. Lu, J., Hu, Z., Wei, S., Wang, L.E., Liu, Z., El-Naggar, A.K., Sturgis, E.M., and Wei, Q. (2009). A novel functional variant (-842G>C) in the PIN1 promoter contributes to decreased risk of squamous cell carcinoma of the head and neck by diminishing the promoter activity. *Carcinogenesis* 30, 1717-1721.

44. Lu, K., Finn, G., Lee, T., and Nicholson, L. (2007). Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nat Chem Biol* 3, 619-629.
45. Lu, K., Hanes, S., and Hunter, T. (1996). A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* 380, 544-547.
46. Lu, K., Liou, Y., and Vincent, I. (2003). Proline-directed phosphorylation and isomerization in mitotic regulation and in Alzheimer's Disease. *Bioessays* 25, 174-181.
47. Lu, K., Liou, Y., and Zhou, X. (2002a). Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. *Trends Cell Biol* 12, 164-172.
48. Lu, K.P., and Hunter, T. (1995). Evidence for a NIMA-like mitotic pathway in vertebrate cells. *Cell* 81, 413-424.
49. Lu, K.P., Suizu, F., Zhou, X.Z., Finn, G., Lam, P., and Wulf, G. (2006). Targeting carcinogenesis: a role for the prolyl isomerase Pin1? *Mol Carcinog* 45, 397-402.
50. Lu, K.P., and Zhou, X.Z. (2007). The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 904-916.
51. Lu, P., Zhou, X., Liou, Y., Noel, J., and Lu, K. (2002b). Critical role of WW domain phosphorylation in regulating phosphoserine binding activity and Pin1 function. *J Biol Chem* 277, 2381-2384.
52. Lu, P., Zhou, X., Shen, M., and Lu, K. (1999). Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* 283, 1325-1328.
53. Mandic, R., Lieder, A., Sadowski, M., Peldszus, R., and Werner, J.A. (2004). Comparison of surface HLA class I levels in squamous cell carcinoma cell lines of the head and neck. *Anticancer Res* 24, 973-979.
54. Mantovani, F., Gostissa, M., Collavin, L., and Del Sal, G. (2004). KeePin' the p53 family in good shape. *Cell Cycle* 3, 905-911.
55. Mantovani, F., Tocco, F., Girardini, J., Smith, P., Gasco, M., Lu, X., Crook, T., and Del Sal, G. (2007). The prolyl isomerase Pin1 orchestrates p53 acetylation and dissociation from the apoptosis inhibitor iASPP. *Nat Struct Mol Biol* 14, 912-920.
56. Mathur, R., Chandna, S., N Kapoor, P., and S Dwarakanath, B. (2011). Peptidyl prolyl isomerase, Pin1 is a potential target for enhancing the therapeutic efficacy of etoposide. *Curr Cancer Drug Targets* 11, 380-392.

57. Matsuura, I., Chiang, K.N., Lai, C.Y., He, D., Wang, G., Ramkumar, R., Uchida, T., Ryo, A., Lu, K., and Liu, F. (2010). Pin1 promotes transforming growth factor-beta-induced migration and invasion. *J Biol Chem* 285, 1754-1764.
58. Miyashita, H., Mori, S., Motegi, K., Fukumoto, M., and Uchida, T. (2003a). Pin1 is overexpressed in oral squamous cell carcinoma and its levels correlate with cyclin D1 overexpression. *Oncol Rep* 10, 455-461.
59. Miyashita, H., Uchida, T., Mori, S., Echigo, S., and Motegi, K. (2003b). Expression status of Pin1 and cyclins in oral squamous cell carcinoma: Pin1 correlates with Cyclin D1 mRNA expression and clinical significance of cyclins. *Oncol Rep* 10, 1045-1048.
60. Monje, P., Hernández-Losa, J., Lyons, R.J., Castellone, M.D., and Gutkind, J.S. (2005). Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1. *J Biol Chem* 280, 35081-35084.
61. Naidu, R., Har, Y.C., and Taib, N.A. (2011). Analysis of peptidyl-propyl-cis/trans isomerase 1 (PIN1) gene ?842(G > C) and ?667(T > C) polymorphic variants in relation to breast cancer risk and clinico-pathological parameters. *Scand J Clin Lab Invest*.
62. Oren, M., and Rotter, V. (2010). Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a001107.
63. Parkin, D., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55, 74-108.
64. Pastorino, L., Sun, A., Lu, P., Zhou, X., Balastik, M., Finn, G., Wulf, G., Lim, J., Li, S., Li, X., et al. (2006). The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid-beta production. *Nature* 440, 528-534.
65. Pawson, T., and Scott, J.D. (2005). Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci* 30, 286-290.
66. Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14, 1837-1851.
67. Psyrri, A., and Fountzilas, G. (2006). Advances in the treatment of locally advanced non-nasopharyngeal squamous cell carcinoma of the head and neck region. *Med Oncol* 23, 1-15.
68. Ragin, C.C., Modugno, F., and Gollin, S.M. (2007). The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res* 86, 104-114.

69. Rahfeld, J.U., Rücknagel, K.P., Schelbert, B., Ludwig, B., Hacker, J., Mann, K., and Fischer, G. (1994). Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. *FEBS Lett* 352, 180-184.
70. Ranganathan, R., Lu, K., Hunter, T., and Noel, J. (1997). Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell* 89, 875-886.
71. Ries, L. (2008.). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005, National Cancer Institute, D. Melbert, Krapcho, M, et al (eds), ed. (Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/, based on November 2007 SEER data submission, posted to the SEER web site).
72. Rippmann, J.F., Hobbie, S., Daiber, C., Guilliard, B., Bauer, M., Birk, J., Nar, H., Garin-Chesa, P., Rettig, W.J., and Schnapp, A. (2000). Phosphorylation-dependent proline isomerization catalyzed by Pin1 is essential for tumor cell survival and entry into mitosis. *Cell Growth Differ* 11, 409-416.
73. Rudd, K.E., Sofia, H.J., Koonin, E.V., Plunkett, G., Lazar, S., and Rouviere, P.E. (1995). A new family of peptidyl-prolyl isomerases. *Trends Biochem Sci* 20, 12-14.
74. Ryo, A., Liou, Y.C., Lu, K.P., and Wulf, G. (2003a). Prolyl isomerase Pin1: a catalyst for oncogenesis and a potential therapeutic target in cancer. *J Cell Sci* 116, 773-783.
75. Ryo, A., Liou, Y.C., Wulf, G., Nakamura, M., Lee, S.W., and Lu, K.P. (2002). PIN1 is an E2F target gene essential for Neu/Ras-induced transformation of mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* 22, 5281-5295.
76. Ryo, A., Nakamura, M., Wulf, G., Liou, Y.C., and Lu, K.P. (2001). Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nat Cell Biol* 3, 793-801.
77. Ryo, A., Suizu, F., Yoshida, Y., Perrem, K., Liou, Y.C., Wulf, G., Rottapel, R., Yamaoka, S., and Lu, K.P. (2003b). Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol Cell* 12, 1413-1426.
78. Schmid, F.X. (2001). Prolyl isomerases. *Adv Protein Chem* 59, 243-282.
79. Schreiber, S.L. (1991). Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 251, 283-287.

80. Seet, B.T., Dikic, I., Zhou, M.M., and Pawson, T. (2006). Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 473-483.
81. Shen, M., Stukenberg, P.T., Kirschner, M.W., and Lu, K.P. (1998). The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins. *Genes Dev* 12, 706-720.
82. Siepe, D., and Jentsch, S. (2009). Prolyl isomerase Pin1 acts as a switch to control the degree of substrate ubiquitylation. *Nat Cell Biol* 11, 967-972.
83. Slaughter, D.P., Southwick, H.W., and Smejkal, W. (1953). Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6, 963-968.
84. Soussi, T., and Wiman, K.G. (2007). Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell* 12, 303-312.
85. Tan, X., Zhou, F., Wan, J., Hang, J., Chen, Z., Li, B., Zhang, C., Shao, K., Jiang, P., Shi, S., et al. (2010). Pin1 expression contributes to lung cancer: Prognosis and carcinogenesis. *Cancer Biol Ther* 9, 111-119.
86. Theuerkorn, M., Fischer, G., and Schiene-Fischer, C. (2011). Prolyl cis/trans isomerase signalling pathways in cancer. *Curr Opin Pharmacol* 11, 281-287.
87. Uchida, T., Fujimori, F., Tradler, T., Fischer, G., and Rahfeld, J.U. (1999). Identification and characterization of a 14 kDa human protein as a novel parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase. *FEBS Lett* 446, 278-282.
88. Vineis, P., Alavanja, M., Buffler, P., Fontham, E., Franceschi, S., Gao, Y., Gupta, P., Hackshaw, A., Matos, E., Samet, J., et al. (2004). Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst* 96, 99-106.
89. Workman, P. (2001). New drug targets for genomic cancer therapy: successes, limitations, opportunities and future challenges. *Curr Cancer Drug Targets* 1, 33-47.
90. Wulf, G.M., Ryo, A., Wulf, G.G., Lee, S.W., Niu, T., Petkova, V., and Lu, K.P. (2001). Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *EMBO J* 20, 3459-3472.
91. Xu, G.G., and Etzkorn, F.A. (2009). Pin1 as an anticancer drug target. *Drug News Perspect* 22, 399-407.
92. Yaffe, M., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X., Stukenberg, P., Rahfeld, J., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M., Fischer, G., et al. (1997). Sequence-specific

- and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science* 278, 1957-1960.
93. Yeh, E.S., and Means, A.R. (2007). PIN1, the cell cycle and cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 381-388.
94. Yoon, H.E., Kim, S.A., Choi, H.S., Ahn, M.Y., Yoon, J.H., and Ahn, S.G. (2012). Inhibition of Plk1 and Pin1 by 5'-nitro-indirubinoxime suppresses human lung cancer cells. *Cancer Lett* 316, 97-104.
95. Zacchi, P., Gostissa, M., Uchida, T., Salvagno, C., Avolio, F., Volinia, S., Ronai, Z., Blandino, G., Schneider, C., and Del Sal, G. (2002). The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature* 419, 853-857.
96. Zheng, H., You, H., Zhou, X.Z., Murray, S.A., Uchida, T., Wulf, G., Gu, L., Tang, X., Lu, K.P., and Xiao, Z.X. (2002). The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature* 419, 849-853.
97. Zhou, X., Kops, O., Werner, A., Lu, P., Shen, M., Stoller, G., Küllertz, G., Stark, M., Fischer, G., and Lu, K. (2000). Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol Cell* 6, 873-883.

9 Anhang

9.1 Humane Pin1-Nukleotidsequenz

Dargestellt ist die cDNA-Sequenz der mRNA für humanes Pin1 (GenBank Acc. No. NM_006221) von 5'- nach 3'-Richtung mit Polyadenylierungssignal (1096 – 1101) und Poly-A-Schwanz. Über der Nukleotidsequenz ist die abgeleitete Aminosäuresequenz (Ein-Buchstaben-Code) von Nukleotid 139 (Start-Methionin; grün markiert) bis 630 (Stopkodon; rot markiert). Das Stopkodon ist in der Aminosäuresequenz durch * dargestellt.

```

1  GGACCGTTAGGGAGCCCAATGGGCGTCGCCGCCAGGCCCGTTGCAGAGCGCGTCTAGCC
61  AATAGGCAGCGGCGGGCGGGCGGGCGGACAGGCCGGCGCAGCTGAGGCGGAGCAGGC
1  M A D E E K L P P G W E K R
121 GCTGCGGCAGGAGGGAAGATGGCGGACGAGGAGAAGCTGCCGCCCGGCTGGGAGAAGCGC
15  M S R S S G R V Y Y F N H I T N A S Q W
181 ATGAGCCGCAGCTCAGGCCGAGTGTACTACTTCAACCACATCACTAACGCCAGCCAGTGG
35  E R P S G N S S S G G K N G Q G E P A R
241 GAGCGGCCAGCGGCAACAGCAGCAGTGGTGGCAAAAACGGGCAGGGGGAGCCTGCCAGG
55  V R C S H L L V K H S Q S R R P S S W R
301 GTCCGCTCGCACCTGCTGGTGAAGCACAGCCAGTCACGGCGGCCCTCGTCTGGCGG
75  Q E K I T R T K E E A L E L I N G Y I Q
361 CAGGAGAAGATCACCCGGACCAAGGAGGAGGCCCTGGAGCTGATCAACGGCTACATCCAG
95  K I K S G E E D F E S L A S Q F S D C S
421 AAGATCAAGTCGGGAGAGGAGGACTTTGAGTCTCTGGCCTCACAGTTCAGCGACTGCAGC
115 S A K A R G D L G A F S R G Q M Q K P F
481 TCAGCCAAGGCCAGGGGAGACCTGGGTGCCCTTCAGCAGAGGTCAGATGCAGAAGCCATTT
135 E D A S F A L R T G E M S G P V F T D S
541 GAAGACGCCCTCGTTTGCCTGCGGACGGGGGAGATGAGCGGGCCCGTGTTCACGGATTCC
155 G I H I I L R T E *
601 GGCATCCACATCATCCTCCGCACTGAGTGAAGGGTGGGGAGCCCAGGCCCTGGCCTCGGGGC
661 AGGGCAGGGCGGCTAGGCCGGCCAGCTCCCCCTTGCCCGCCAGCCAGTGGCCGAACCCCC
721 CACTCCCTGCCACCGTCACACAGTATTTATTGTTCCCAATGGCTGGGAGGGGGGCCCTT
781 CCAGATTGGGGGCCCTGGGGTCCCCACTCCCTGTCCATCCCCAGTTGGGGCTGCGACCGC
841 CAGATTCTCCCTTAAGGAATTGACTTCAGCAGGGGTGGGAGGCTCCCAGACCCAGGGCAG
901 TGTGGTGGGAGGGGTGTTCCAAAGAGAAGGCCCTGGTCAGCAGAGCCGCCCGTGTCCCCC
961 CAGGTGCTGGAGGCAGACTCGAGGGCCGAATTGTTTCTAGTTAGGCCACGCTCCTCTGTT
1021 CAGTCGCAAAGGTGAACACTCATGCGGCCAGCCATGGGCCCTCTGAGCAACTGTGCAGC
1081 ACCCTTTCACCCCAATTAAACCCAGAACCCTGCTCTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

9.2 Abkürzungsverzeichnis

a.d.	Aqua destillata
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
cDNA	complementary DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylamino]- Propansulfat
CIP	Calf intestinal alkaline phosphatase (Alkalische Phosphatase)
CO ₂	Kohlendioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGF	Epidermal growth factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
FCS	Fetal calf Serum (Fötale Kälberserum)
FKBP	FK506 bindendes Protein
GFP	Green fluorescent protein (Grünes Fluoreszenzprotein)
h	Stunde
HED	bis(2-hydroxyethyl)Disulfid
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs)
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	Horseradish-Peroxidase
kDa	Kilodalton
m	milli

M	Molar
min	Minute
MW	Molecular Weight (Molekulargewicht)
μ	mikro
n	nano
PBS Phosphate Buffer Saline	Phosphate Buffer Saline
pH	potentia Hydrogenii
Pin1	Protein interacting with NIMA 1
PPIase	Peptidyl-Prolyl-Isomerase
Pro	Prolin
RH	Relative humidity (Relative Luftfeuchtigkeit)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
SCC	Squamous Cell Carcinoma, (Plattenepithelkarzinom)
SDS	Sodiumdodecylsulfate
Ser	Serin
siRNA	Small interfering RNA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
TNM	Tumor-Node-Metastasis (Primärtumor- Lymphknoten-Fernmetastase)
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
UVPP	Uvulovelopalatopharyngoplastik
WB	Western Blot

9.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.....	4
Abbildung 2.....	6
Abbildung 3.....	9
Abbildung 4.....	32
Abbildung 5.....	35
Abbildung 6.....	45
Abbildung 7.....	47
Abbildung 8.....	47
Abbildung 9.....	49
Abbildung 10.....	52
Abbildung 11.....	54
Abbildung 12.....	55
Abbildung 13.....	56
Abbildung 14.....	57
Abbildung 15.....	58
Abbildung 16.....	59

9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.....	8
Tabelle 2.....	12
Tabelle 3.....	19
Tabelle 4.....	20
Tabelle 5.....	20
Tabelle 6.....	21
Tabelle 7.....	21
Tabelle 8.....	22
Tabelle 9.....	23
Tabelle 10.....	24
Tabelle 11.....	25
Tabelle 12.....	37
Tabelle 13.....	50

9.5 Publikationen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden zum Teil in der Publikation „Wiegand S, Dakic B, Rath AF, Makarova G, Sterz C, Meissner W, Bette M, Adamkiewicz J, Müller-Brüsselbach S, Müller R, Werner JA, Mandic R. The rotamase Pin1 is up-regulated, hypophosphorylated and required for cell cycle progression in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2009 Oct;45(10):e140-9. Epub 2009 Jun 6.” veröffentlicht.

9.7 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:

Aigner, Al-Fakhri, Alter, Arnold, Aumüller, Bals, Barth, Basler, Baum, Bauer, Baumann, Berger, Bien, Boekhoff, Büch, Burchert, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, del Rey, Dominguez, Donner-Banzhoff, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Funck, Geks, Gemsa, Geus, Görg, Gress, Grimm, Grundmann, Gudermann, Happle, Hasilik, Hellwig, Hertl, Herzum, Höffken, Hofmann, Hörle, Hoyer, Jungclas, Kann, Kern, Kill, Klenk, Klose, Köhler, Köhler, Koolman, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Lang, Lemansky, Lill, Liss, Loff, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Mennel, Mittag, Mederos, Moll, Moosdorf, Müller, Mueller, Neubauer, Neumüller, Nockher, Oeffner, Oertel, Pagenstecher, Plant, Printz, Rausch, Renz, Röhm, Röper, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schäfer, Schmitt, Schofer, Seifert, Seitz, Sesterhenn, Sommer, Stief, Strauch, Suske, Steininger, Sundermeyer, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf, Yu, Zemlin.

9.6 Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. J. A. Werner herzlich für die Möglichkeit danken, diese Doktorarbeit in dem von ihm geleiteten Medizinischen Zentrum für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde der Philipps-Universität Marburg durchgeführt haben zu dürfen. Vielen Dank für die Unterstützung.

Ganz besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Robert Mandic, der mir die Möglichkeit gegeben hat, unter seiner Anleitung diese Arbeit durchzuführen, der mich bei dieser Arbeit durchwegs intensiv und gut betreute, und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen herzlichen Dank für die lange, stetige und sehr gute Zusammenarbeit bei der Verwirklichung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Rolf Müller möchte ich sehr für die Hilfe und Unterstützung, die er und das Institute of Molecular Biology and Tumor Research bei dieser Arbeit zur Verfügung gestellt haben, danken.

Im Labor standen mit bei der Durchführung aller Experimente stets die beiden MTAs Frau Grazyna Sadowski und Frau Roswitha Peldszus zur Seite. Zu jeder Zeit konnte ich auf ihre Hilfe und ihren Rat bauen und ich habe viel von ihnen lernen können. Dafür danke ich beiden von Herzen.

Meiner Mit-Doktorandin Branka Dakic danke ich sehr für die Anleitung und die große und sehr zuverlässige Hilfe bei der Durchführung der 2D-Gelelektrophorese-Experimente. Auch meiner Mit-Doktorandin Fiona Rodepeter möchte ich für die tatkräftige Hilfe bei den Klonierungsarbeiten danken. Ebenfalls großer Dank gilt Frau Dr. Susanne Wiegand, die mir bei den durchflusszytometrischen Experimenten sehr geholfen hat.

Für die Nutzung des konfokalen Laser-Scanning Mikroskopes und für die Anleitung beim Mikroskopieren möchte ich mich bei Herrn Dr. M. Bette (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Philipps-Universität Marburg) bedanken.

Herrn PD Dr. Wolfgang Meißner (Institute of Molecular Biology and Tumor Research, Philipps-Universität Marburg) danke ich für die Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der quantitativen PCR-Untersuchungen.

Herrn Dr. Adamkiewicz sowie den MTAs Herrn Bernhard Wilke und Frau Margitta Alt vom Institute of Molecular Biology and Tumor Research der Philipps-Universität Marburg danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Durchfluss-Zytometrie bzw. der 2D-Gelelektrophorese. Herrn Thorsten Volkmann (Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie der Philipps-Universität Marburg) danke ich ebenfalls für die technische Unterstützung bei der Durchflusszytometrie.

Herrn Dr. Ansgar Schmidt aus dem Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg möchte ich besonders für seine große Hilfe und guten Ratschläge beim Abfassen der Arbeit danken.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken, bei meinen Geschwistern Juliane und Philipp, die mir durch ihre ständige Hilfsbereitschaft zur Seite stehen, und besonders bei meinen Eltern, die mir das Studium und auch diese Arbeit ermöglichten und mich bei all meinen Vorhaben unterstützen.