

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie

an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Prof. Dr. med. H. Dralle

Adenin-Uracil-reiche-Ribonukleinsäure-bindender-Faktor-1 (AUF1)

Isoformen-Expression in Schilddrüsentumorzelllinien

und in Schilddrüsengeweben

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Betreuer Prof. Dr. rer. nat. Cuong Hoang-Vu

von Lars Brodauf

geboren 06.01.1982 in Freiberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. H. Dralle (Halle)

2. Prof. Dr. D. Führer (Leipzig)

Datum der Verteidigung 07.08.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014207

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014207>]

Meinen Eltern

Referat und bibliographische Daten

Die Regulationsmechanismen des mRNA-Stoffwechsels treten zunehmend in den Fokus der Erforschung menschlicher Tumore. AUF1 ist ein Protein, das den Abbau, die Lokalisation von mRNA und sogar die Transkription beeinflusst und somit eine direkte Rolle in der Genexpression der Zelle spielt. In dieser Arbeit wurde erstmals die AUF1-Isoformenexpression in Schilddrüsenzellen untersucht. Mittels Westernblotanalysen wurden drei Tumorzelllinien (FTC-133, B-CPAP, 8505C), sowie Normal- (n= 4), Struma- (n= 10), Adenom- (n= 10), FTC- (n= 7), PTC- (n= 13) und UTC-Gewebe (n= 10) charakterisiert. Ergänzend wurden Gefrierschnitte von Normal- (n=1), Struma- (n= 10), Adenom- (n=10), FTC- (n=10), PTC-(n=10) und UTC-Geweben (n= 10) immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet. Wie beeinflussbar die Expression von AUF1 ist, sollten Stimulationsversuche an den drei Tumorzelllinien untersuchen. In allen untersuchten Proben ließ sich AUF1 mit seinen vier Isoformen nachweisen, wobei die Anteile der Isoformen p37 und p40 bei den Zelllinien immer stark vertreten waren und die Isoformen p42 und p45 in den Zelllinien FTC-133 und 8505C fast vernachlässigbar gering exprimiert wurden. Durch die verwendeten Stimulantien ließ sich keine bevorzugte Signaltransduktion entschlüsseln, eher war mit allen ein immer gleiches Bild der Überexpression für jede Zelllinie zu erkennen. Mit beiden Untersuchungsmethoden zeigte sich bei den Patientenproben ein klares Gefälle in der Gesamtexpression, hierbei wurde bei den Normalgeweben eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den malignen Entartungen festgestellt. Neben der Gesamtexpression zeigten sich deutliche Unterschiede in der Isoformenverteilung, bei der die Normalgewebe eine Mittelstellung zwischen den benignen und malignen Geweben einnehmen. Auch in der Proteinlokalisierung zeigten sich Unterschiede zwischen den Entitäten, somit wurde das Verhältnis der Proteinmenge zwischen Kern und Cytosol mit steigender Malignität stetig kleiner. Die hier gezeigten Daten stellen die wichtige Rolle von AUF1 in der Schilddrüse klar heraus und die deutlichen Unterschiede in der Expression ermöglichen eine Verwendung als diagnostischen Marker.

Brodauf, Lars: Adenin-Uracil-reiche-Ribonukleinsäure-bindender-Faktor-1 (AUF1) Isoformen-Expression in Schilddrüsentumorzelllinien und in Schilddrüsengeweben.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 75 Seiten, 2007

Inhaltsverzeichnis

Referat und bibliographische Daten	II
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Schilddrüse	1
1.2 Benigne Schilddrüsentumore	1
1.2.1 Struma.....	1
1.2.2 Schilddrüsenadenom.....	2
1.3 Maligne Schilddrüsentumore	2
1.3.1 Follikuläres Schilddrüsenkarzinom - FTC	3
1.3.2 Papilläres Schilddrüsenkarzinom - PTC	3
1.3.3 Undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom - UTC.....	3
1.4 Messenger-RNA.....	4
1.4.1 Posttranskriptionelle Regulation durch Adenin-Uracil-reiche-Elemente (ARE).....	6
1.4.2 Klassen der Adenin-Uracil-reichen-Elemente (ARE)	6
1.5 AUF1 - Adenin-Uracil-reiche-Ribonukleinsäure-bindender-Faktor-1	7
1.6 Regulation der AUF1-Expression durch Stimulantien.....	10
1.7 Zielsetzung	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Chemikalien, Geräte und Hilfsmittel	13
2.1.1 Chemikalien (alphabetische Reihenfolge)	13
2.1.2 Geräte (alphabetische Reihenfolge).....	14
2.1.3 Hilfsmittel und Antikörper (alphabetische Reihenfolge)	15
2.2 Schilddrüsenzelllinien und Patientengewebe	16
2.2.1 Patientengewebe für die Westernblotuntersuchung	17
2.2.2 Patientengewebe für Immunhistochemie.....	17
2.2.3 Schilddrüsenzelllinien	18
2.3 Zellkultivierung	18
2.3.1 Passagierung	19
2.3.2 Stimulationsversuche	19
2.3.3 Proteingewinnung aus Zelllinien	20
2.4 Proteingewinnung aus Patientengeweben	20
2.5 Proteinbestimmung.....	21
2.6 Westernblot	21
2.6.1 Herstellen der Elektrophoresegele (SDS-Page).....	21

2.6.2	Probenvorbereitung und Gelelektrophorese	23
2.6.3	Semidry-Blotting	24
2.6.4	Ponceau S Färbung.....	24
2.6.5	Detektion durch Antikörper	25
2.6.6	Chemilumineszenzreaktion	26
2.6.7	Auswertung	27
2.7	Herstellung von Gefrierschnitten aus Patientengeweben	28
2.7.1	Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten.....	28
2.7.2	Auswertung	29
2.7.3	Statistische Methoden	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Ergebnisse der Schilddrüsenzelllinien	31
3.1.1	AUF1 in den Schilddrüsenzelllinien 8505C, B-CPAP und FTC-133	31
3.1.2	Einfluss der Stimulation auf die Expression von AUF1 in Schilddrüsenzelllinien	33
3.2	Ergebnisse der Patientengewebe.....	43
3.2.1	AUF1-Expression in Patientengeweben in der Westernblotuntersuchung.....	44
3.2.2	AUF1-Expression und Verteilung in Patientengeweben in Gefrierschnitten	48
4	Diskussion	54
4.1	AUF1 in Schilddrüsenzelllinien	55
4.1.1	Einfluss der Stimulation auf die Gesamtexpression von AUF1 in Schilddrüsenzelllinien	55
4.1.2	Einfluss der Stimulation auf die Isoformenzusammensetzung von AUF1	56
4.2	AUF1 in Patientengeweben.....	57
5	Perspektive.....	61
6	Zusammenfassung	62
	Literaturverzeichnis	64
	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	72
	Thesen.....	74
	Tabellarischer Lebenslauf.....	76
	Selbstständigkeitserklärung	77
	Danksagung	78

Abkürzungsverzeichnis

2-D	2-dimensional
3'-UTR	3'-untranslatierte-Region
5'-UTR	5'-untranslatierte-Region
8505C	Schilddrüsenzelllinie eines undifferenzierten Schilddrüsenkarzinoms
%	Prozent
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	Bidestilliertes Wasser
ARE	Adenin-Uracil-reiche-Elemente
ATP	Adenosintriphosphat
AUF1	Adenin-Uracil-reiche-Ribonukleinsäure-bindender-Faktor-1
B-CPAP	Schilddrüsenzelllinie eines papillären Schilddrüsenkarzinoms
BSA	Rinderserumalbumin
Bzw.	beziehungsweise

C	Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDK	Cyclin-Dependent-Kinase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM/F12	Dulbecco's modified Eagle's Minimum Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
FCS	Fötale Kälberserum
FTC	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom
FTC-133	Schilddrüsenzelllinie eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase

GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
hnRNP	Heteronukleares Ribonukleo-Protein
HRP	Horseradish Peroxidase
IGF	Insulin-like Growth Factor
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LSAB	Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode
mA	Milliampere
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MM	Massenmarker
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ng	Nanogramm
n.s.	nicht signifikant
NSE	neuronenspezifische Enolase
p16	Protein p16 der Familie der CDK-Inhibitoren
p21	Protein p21 der Familie der CDK-Inhibitoren
p37	Isoform von AUF1 mit einem Molekulargewicht von 37kDa
p40	Isoform von AUF1 mit einem Molekulargewicht von 40kDa
p42	Isoform von AUF1 mit einem Molekulargewicht von 42kDa
p45	Isoform von AUF1 mit einem Molekulargewicht von 45kDa
p53	Protein für die Kontrolle des fehlerfreien Aufbaus der DNA
PBS	Phosphat Buffered Saline
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate
PTC	Papilläres Schilddrüsenkarzinom
PVDF	Polyvinylidifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNasen	Ribonukleinsäuren-abbauende Enzyme

S100	Protein das Kalziumionen bindet und so z.B. Proteinkinasen beeinflusst
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SI	stärkste Intensität
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming Growth Factor
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSH	Schilddrüsen-stimulierendes Hormon
Tween	Polyoxyethylene Sorbitan Monolaureate
μ U	Mikrounit
UTC	Undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die Schilddrüse

Die Schilddrüse gehört zu den endokrinen Drüsen und weist ein Gewicht von etwa 20 bis 30g auf. Sie liegt am Hals unterhalb des Kehlkopfes und umfasst hier die Luftröhre von ventral halbkreisförmig. Meist besteht sie aus einem rechten und einem linken Lappen, die auf Höhe des zweiten bis vierten Trachealrings durch einen Isthmus verbunden sind. Die äußere Form wird meist als u- oder schmetterlingsförmig beschrieben.

Mit dem Schilddrüsenhormon Triiodthyronin und dem Prohormon Thyroxin nimmt die Schilddrüse eine wichtige Rolle im Stoffwechsel des Menschen ein. So übt sie unter anderem einen Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch und die Wärmeproduktion aus. Über den Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Fettstoffwechsel steuert sie Wachstum bzw. Entwicklung und kann das Zentralnervensystem, die Muskelaktivität und den Wasserhaushalt beeinflussen. Außerdem produzieren C-Zellen, die einen anderen Entwicklungsursprung haben und in das Schilddrüsengewebe eingewandert sind, Kalzitonin, das eine wichtige Rolle im Calcium- und Phosphathaushalt spielt und hier für die Feinregulation zuständig ist.

1.2 Benigne Schilddrüsentumore

Die Schilddrüsentumore mit einem epithelialen Ursprung kann man in benigne und maligne Tumore unterteilen. Hierbei lässt sich eine Vielzahl anatomischer Bauarten und Differenzierungsgrade unterscheiden. Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Varianten kurz vorgestellt, beginnend mit den benignen Formen Struma und Adenom.

1.2.1 Struma

Der Begriff Struma wird sowohl als Symptom als auch als Diagnose verwendet. Als Symptom bezeichnet es eine Vergrößerung der gesamten Schilddrüse oder Teile dieser, unabhängig von Pathogenese und Dignität. Somit können viele Erkrankungen der Schilddrüse als Ursache zugrunde liegen, zum Beispiel Jodmangel, Entzündungen, Tumore, Enzymdefekte und Akromegalie.

Als Diagnose beschreibt Struma eine benigne Schilddrüsenvergrößerung ohne Verlust der Differenzierung. Trotzdem umfasst der Begriff Struma eine morphologisch und pathogenetisch heterogene Krankheitsgruppe. Entscheidend ist jedoch das benigne, also ein nicht invasives und nicht metastasierendes Wachstum.

In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff Struma als Diagnose verwendet.

1.2.2 Schilddrüsenadenom

Ein weiterer benigner Schilddrüsentumor ist das Schilddrüsenadenom. Es kann solitär als auch multiple auftreten. Adenome können unterschiedliche Reifegrade aufweisen (trabekulär, tubulär, mikro-, normo-, makrofollikulär) und sind meist in sonst unauffälliges Schilddrüsengewebe eingebettet. Sie können endokrin aktiv sein und auch ohne die Steuerung des hypophysären Thyroidea-stimulierendes Hormon (TSH) Jod aufnehmen, speichern und Schilddrüsenhormone abgeben. Eine maligne Entartung tritt selten auf, je nach Baumuster lassen sich die Adenome nur schwer histologisch einordnen.

1.3 Maligne Schilddrüsentumore

Die malignen Schilddrüsentumore zählen mit einem Anteil von 0,5% bis 2% an allen bösartigen Geschwülsten [*Franceschi et al., 1994; Mazzaferri, Jhiang, 1994*] zu den seltenen Krebserkrankungen. So steht das Schilddrüsenkarzinom in Deutschland bei Frauen an dreizehnter und bei Männern an zwanzigster Stelle der Häufigkeiten maligner Tumore. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens steigt mit dem Alter, das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt zwischen 45 und 50 Jahren. Frauen sind etwa zwei- bis viermal so oft betroffen wie Männer.

In dieser Arbeit sollen follikuläre, papilläre und undifferenzierte Karzinome betrachtet werden, die sich aus Thyreozyten entwickeln. Hierbei machen follikuläre und papilläre Karzinome etwa 80% und undifferenzierte Karzinome circa 10% aller malignen Schilddrüsentumore aus. Die restlichen 10% verteilen sich auf das medulläre Karzinom (5%) und sonstige Krebsarten, wie Sarkome, maligne Hämangioendotheliome, maligne Lymphome oder Metastasen [*Becker, 1984*].

1.3.1 Follikuläres Schilddrüsenkarzinom - FTC

Follikuläre Schilddrüsenkarzinome weisen meist einen soliden und abgekapselten Aufbau mit mikrofollikulären oder trabekulären Strukturen auf [Rosai et al., 1992a].

Am häufigsten sind Patienten im Alter von 50 Jahren betroffen [Coburn, Wanebo, 1995], bevorzugt in Gebieten mit endemischem Jodmangel. Große Unterschiede zeigen sich zwischen dem minimal-invasiven und hoch-invasiven Typ, wobei die 10-Jahres-Überlebensrate bei minimal-invasiven Karzinomen um 50% höher ist [Chow et al., 2002].

FTC's zeigen eine frühzeitige hämatogene Metastasierung, vor allem in Knochen und in der Lunge. Lymphknoten sind selten von Metastasen befallen.

1.3.2 Papilläres Schilddrüsenkarzinom - PTC

Das papilläre Schilddrüsenkarzinom zeichnet sich durch multifokalen Befall eines oder beider Schilddrüsenlappen aus [Rosai et al., 1992b]. Kennzeichnend sind papilläre Strukturen, bei denen ein einreihiges Epithel einen Bindegewebsstock einschließt. Es kann zu einer dachziegelartigen Überlagerung der Zellkerne und zu umschriebenen Verkalkungsherden im Cytoplasma (Psammonkörperchen [Hofstaedter, 2001]) kommen. Der Altersgipfel beim PTC liegt zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr (80% der Patienten sind unter 40 Jahre alt). Mit über 50% ist es der häufigste Schilddrüsentumor [Schmid, 1998]. PTC's metastasieren zunächst über die Lymphgefäße in die regionalen Lymphknoten. Erst später erfolgt eine hämatogene Metastasierung. Insgesamt handelt es sich meist um ein langsames Wachstum und die Prognose für behandelte Patienten ist als sehr gut einzuschätzen.

1.3.3 Undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom - UTC

Im undifferenzierten Schilddrüsenkarzinom zeigen sich polymorphe Zellen und treten viele Mitosen und Nekrosen [Rosai et al., 1992c] auf, was für einen hohen und schnellen Zellumsatz steht und für ein großes aggressives Potential spricht. Befallen sind vor allem ältere Patienten über 55 Jahre [Coburn, Wanebo, 1995]. Das Karzinom wächst sehr schnell und invasiv, weiterhin zeigt sich eine frühzeitige lymphogene und hämatogene Metastasierung in Leber, Lunge, Knochen und Gehirn. Die Prognose ist sehr ungünstig und meist versterben die Patienten an den lokalen Komplikationen

des Tumors in den ersten sechs Monaten. Über 95% der Patienten versterben in den ersten fünf Jahren nach Diagnosestellung.

Eine mögliche Entstehung des UTC's aus einem FTC oder PTC wurde von einigen Autoren auf Grund verschieden differenzierter Karzinomanteile vermutet [Ordóñez *et al.*, 1991; Venkatesh *et al.*, 1990; Goerges, 2001], neuere Diskussionen jedoch ziehen eine Entstehung aus pluripotenten Vorläuferzellen in Betracht, welche ebenso die verschieden differenzierten Areale in UTC's erklären würde.

Interessante Ergebnisse zeigten auch Versuche mit Retinsäure, bei denen eine Differenzierung bzw. Redifferenzierung erlangt werden konnte [Übersicht: Schmutzler, Köhrle, 2000].

1.4 Messenger-RNA

Für die Expression eines Gens ist die messenger-RNA (mRNA) als Bindeglied zwischen DNA- und Proteinebene von elementarer Bedeutung. Hierbei ist die Menge der jeweiligen mRNA, die für ein Protein codiert, ein bestimmender Faktor. Welche Menge an Protein letztlich translatiert wird, hängt jedoch auch von der posttranskriptionellen Modulation und dem Abbau der mRNA ab. Somit sind diese neben der Regulation der Transkription wichtige Kriterien der Genregulation.

Die Halbwertszeit einer mRNA variiert zwischen wenigen Minuten und mehreren Stunden, oder Tagen. Der Abbau der mRNA findet in sogenannten P-Bodies (Processing-Bodies) statt. Diese sind reich an RNasen, was einen schnellen RNA-turnover möglich macht.

Wie in Abbildung 1 dargestellt, lässt sich die eukaryotische mRNA vor der Translation grob in drei Teile teilen, wobei der codierende Teil (Exons) zwischen zwei Bereichen liegt, die nicht translatiert werden (5'-UTR und 3'-UTR).

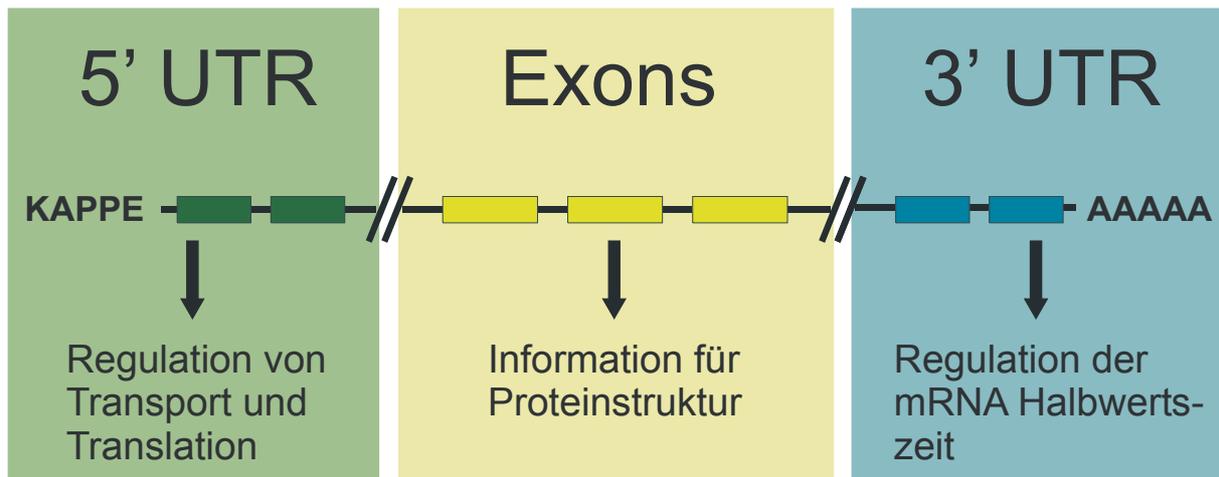


Abbildung 1: Schematische Darstellung menschlicher reifer mRNA

Davor befindet sich die 5'-Kappe mit etwa 100 bis 200 Nukleotiden [Pesole et al., 2001] und eine 5'-untranslatierte-Region (5'-UTR). Nach der genetischen Information folgt die sogenannte 3'-untranslatierte-Region (3'-UTR). Das Ende der 3'-UTR bildet der Poly-A-Strang mit einer durchschnittlichen Länge zwischen 100 und 250 Adenin-Reste. Vor dem Poly-A-Strang befindet sich ein Bereich von circa 600 Nukleotiden, der ebenfalls nicht der Translation zur Verfügung steht, jedoch sogenannte cis-regulatorische Elemente enthält, die eine posttranskriptionelle Modulation möglich machen. Hierbei ist sowohl die Sequenz als auch die Sekundärstruktur für die Regulation wichtig. Die Längen der 5'- und 3'-UTR variieren innerhalb einer Spezies [Pesole et al., 2001].

Der Hauptweg des RNA-Abbaus beginnt vorwiegend mit einer Verkürzung des 3'-Poly-A-Endes durch Deadenylierung [Korner et al., 1998]. Wird es auf eine Länge von 25 bis 60 Adenosin-Reste verkürzt kommt es zu einer schnellen Degradierung [Brown, Sachs, 1998]. Es ist aber auch ein Abbau unabhängig von der Deadenylierung des Poly-A-Stranges möglich. Hierbei wird die mRNA endonukleolytisch geschnitten, meist beginnend in der 3'-UTR vor dem Poly-A-Strang. Somit spielt dieser mRNA-Abschnitt eine entscheidende Rolle für die Stabilität der zu translatierenden mRNA und dadurch auch für die Menge an synthetisiertem Protein. Eine Veränderung des Stabilitätsverhaltens wird mit der Entstehung schwerer Krankheiten, z.B. Tumorerkrankungen, in Verbindung gebracht [Guhaniyogi, Brewer, 2001].

1.4.1 Posttranskriptionelle Regulation durch Adenin-Uracil-reiche-Elemente (ARE)

Die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression wird, wie in Abschnitt 1.4 beschrieben, durch Bereiche in der 3'-UTR möglich. Über die Bindung von Proteinen bzw. Sekundärstrukturen an die cis-regulatorischen Elemente wird der mRNA-Transport vom Nukleus in das Cytoplasma, die Translationseffizienz [van der Velden, Thomas, 1999], die subzelluläre Lokalisation der mRNA [Jansen, 2001] und die Regulation ihrer Stabilität [Bashirullah et al., 2001] beeinflusst.

Im Vergleich zur Regulation auf DNA-Ebene sind hier sowohl die Primärstruktur, als auch die Sekundär- und die Tertiärstruktur der Bindungspartner entscheidend.

Für den in dieser Arbeit untersuchten Faktor AUF1 ist aus der Gruppe der cis-regulatorischen Elemente das Adenin-Uracil-reiche-Element (ARE) von besonderer Bedeutung. Da es sich dabei um ein Sequenzmotiv handelt, steht hier die Primärstruktur im Vordergrund. Etwa 8% der menschlichen mRNA weisen ARE auf [Bakheet et al., 2001]. Durch sie kann die Stabilität und somit die Halbwertszeit von mRNA entscheidend beeinflusst werden.

1.4.2 Klassen der Adenin-Uracil-reichen-Elemente (ARE)

Es gibt drei Klassen dieser Strukturelemente [Chen, Shuy, 1995; Mignone et al., 2002].

Die Klassen I und II zeichnen sich durch Wiederholungen des Pentanukleotids AUUUA aus, die bei der Klasse III nicht auftreten [Peng et al., 1996].

In der Klasse I kommen eine oder mehrere Wiederholungen der AUUUA-Sequenz neben einem Uracil-reichen Bereich vor. Durch sie wird die cytoplasmatische Deadenylierung reguliert, wobei der Poly-A-Strang bis auf eine Länge von 30 bis 60 Adenin-Resten degradiert wird und anschließend der komplette Abbau der mRNA durch Endo- und Exonukleasen erfolgt. Vertreter dieser Klasse sind hauptsächlich nukleare Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-fos und c-myc, aber auch Cytokine wie Interleukin 4 und 6.

Für die Klasse II AREs sind Tandemwiederholungen des AUUUA-Pentamers typisch, die in einem stromaufwärts gelegenen AU-reichen Bereich liegen. Durch diese wird ein asynchroner cytoplasmatischer Abbau reguliert, so werden verschiedene Transkripte unterschiedlich schnell abgebaut. Im Unterschied zur Klasse I werden

hier bei der Deadenylierung alle Adenin-Reste abgebaut bevor es zur kompletten Degradierung kommt. Beispiele für die Klasse II sind Cytokin GM-CSF, Interleukin 2, Tumor-Nekrose-Faktor- α und Interferon α [Lagnado et al., 1994; Mignone et al., 2002].

In der dritten Klasse lassen sich keine regelmäßigen AUUUA-Sequenzen finden.

Ein Beispiel hierfür ist die mRNA von c-jun mit einem U-reichen Element [Peng et al., 1996].

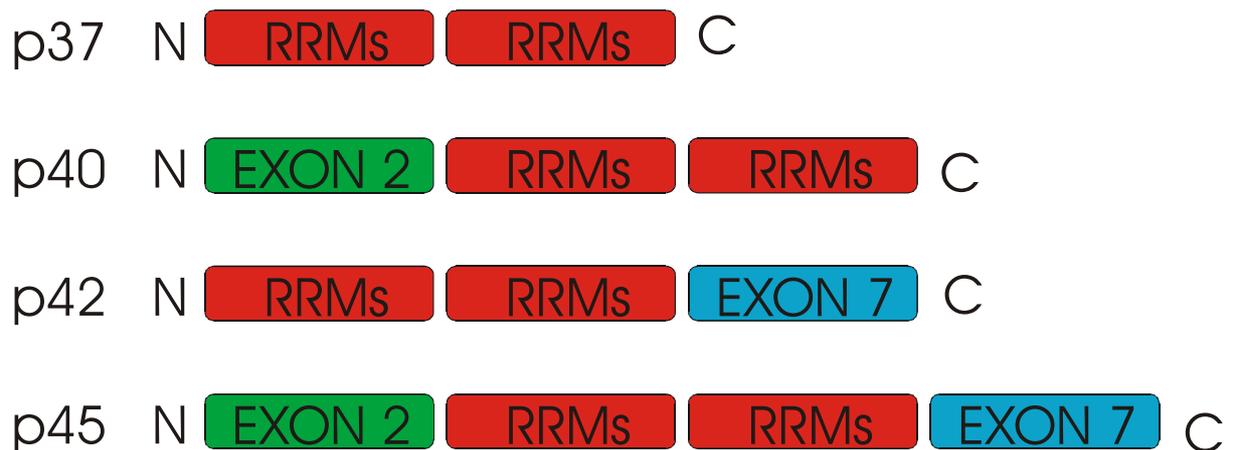
Für die Klassen I und II lässt eine Art Codierung beschreiben, die durch die verschiedene Anzahl von AUUUA-Pentameren, deren Abstand zueinander und der Verteilung im 3' untranslatierten Bereich verschlüsselt wird und so eine Vielzahl an Möglichkeiten an Baumustern bietet, um in die mRNA-Degradierung einzugreifen.

Durch diese Strukturen können z.B. Proteine, die in AU- und U-reichen Regionen binden den Abbau von mRNA regulieren und damit einen direkten Einfluss auf die Genexpression ausüben. Jede Störung dieses sensiblen Systems kann schwere Folgen für die Zelle und damit für den Organismus haben.

1.5 AUF1 - Adenin-Uracil-reiche-Ribonukleinsäure-bindender-Faktor-1

AUF1 wurde 1991 erstmals von Brewer isoliert und 1993 durch Zhang et al. identifiziert. Es gehört zur Familie der heteronuklearen Ribonukleo-Proteine und wird auch als hnRNP D bezeichnet. Diese Familie wurde erstmals 1986 beschrieben, umfasst 20 Proteine, die mit hnRNP A bis U abgekürzt werden, nach ihrem Gewicht von 34kDa bis 120kDa eingeteilt [Chung, Wooley, 1986; Dreyfuss, 1986] wurden und alle an RNA binden können. Dies erfolgt bevorzugt kurz nach der RNA-Synthese. Dabei wurden zum Teil synergistische und kooperative Vorgänge in dieser Familie beobachtet.

Im Genom des Menschen liegen die Genabschnitte für AUF1 auf dem Chromosom 4q21 [Dempsey et al., 1998] und dem Chromosom Xq12 [Wagner et al., 1996]. Es wird ein Transkript gebildet, aus dem durch alternatives Splicen vier unterschiedliche Isoformen entstehen [Wagner et al., 1998] (Abb. 2).



RRMs = RNA recognitiv motifs

Abbildung 2: Schematische Darstellung der vier AUF1-Isoformen mit entsprechend unterschiedlich translatierten Exons

Da diese vier Isoformen nach ihrem Molekulargewicht benannt wurden, bezeichnet man sie als p37, p40, p42 und p45, wobei die Zahl jeweils für das Gewicht in kDa steht. Die größte Isoform p45 besteht aus 10 Exons [Dempsey et al., 1998]. Jede Isoform enthält zwei Domänen (RNA recognitiv motifs, RRM), die es ihr erlauben an mRNA, im Speziellen an AREs zu binden. Die Liste der möglichen Ziele für AUF1-Isoformen ist lang und hier sollen nur einige aufgezählt werden: Proto-Onkogene (c-fos, c-jun, c-myc, egr-1), Wachstumsfaktoren (VEGF, EGF, IGF, TGF), Zytokine (Interleukine, Interferone), Zellzyklusregulatoren (p16, p21; Cyclin A, B1, E2; CDK 2 und 6) [Chen et al., 1995]. Weiter konnte auch eine Bindung von AUF1 an DNA gezeigt werden [Katahira et al., 2001].

Dies zeigt in welchem komplexen und wichtigen System AUF1 eingebettet ist und erklärt den derzeit kontroversen Stand der Ergebnisse. Als sicher gilt der Einfluss auf die RNA Degradation [Mukherjee et al., 2002], möglicherweise über ein Zusammenspiel von ARE-bindenden Proteinen und Exosomen [Chen et al., 2001]. Weiter scheint die Funktion vom Differenzierungsgrad der Zelle, der Phase im Zellzyklus und dem Phosphorylierungszustand der jeweiligen Isoform abzuhängen. So konnte für die Isoform p40 in phosphorylierter Form ein destabilisierendes und in dephosphorylierter Form ein stabilisierendes Verhalten nachgewiesen werden [Wilson et al., 2003].

Die Funktion des Exons 2, welches in den Isoformen p40 und p45 auftritt, ist

weitgehend ungeklärt. Das Exon 7 in den Isoformen p42 und p45 beeinflusst die Ubiquitinierung dieser Isoformen, im Speziellen führt es zu einer geringeren Ubiquitinierung [Laroia, Schneider, 2002]. Dies hat Einfluss auf die Halbwertszeit des AUF1-Proteins und somit auf die Zeit, um die mRNA-Degradation zu modulieren. Unabhängig davon zeigten verschiedene Untersuchungen, dass alle vier sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma zu finden sind (Abb. 3).

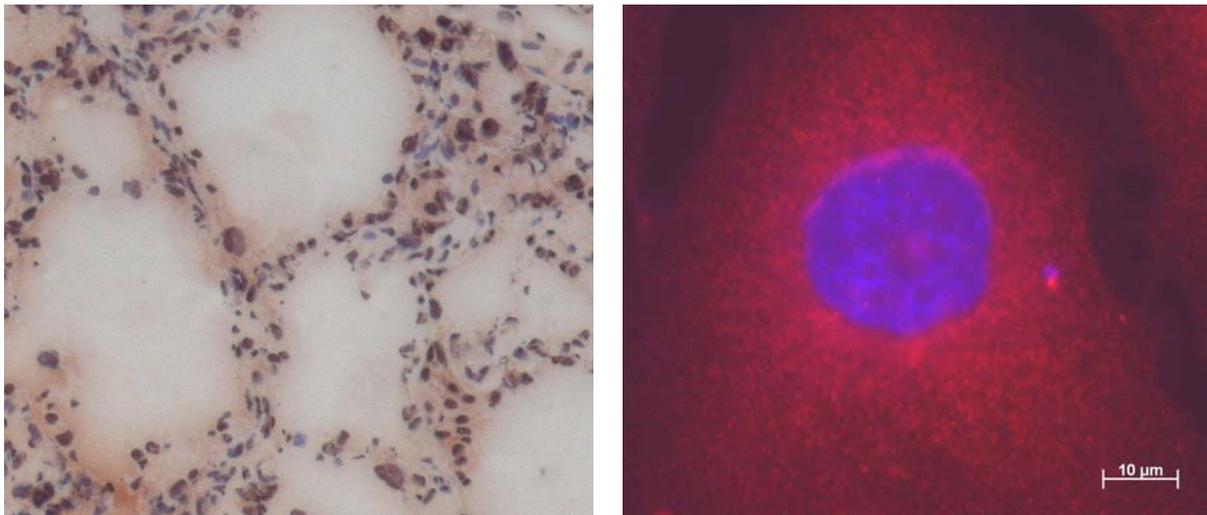


Abbildung 3: Beispiele für die Lokalisation von AUF1

links: FTC Patientengewebe mittels Immunhistochemie (40x)

rechts: Zelllinie FTC 133 mittels Immunfluoreszenz (100x)

Somit ist auch die Lokalisation von AUF1 entscheidend für seine Funktionalität. Es zeigte sich sogar, dass AUF1 erst wieder in den Zellkern gelangen muss, um seine Rolle wahrnehmen zu können [Chen et al., 2004]. In der Isoform p37 wurde C-terminal eine Sequenz entschlüsselt, die den Kernimport ermöglicht. Dies erlaubt eine frühe Bindung an die Ziel-mRNA und erfolgt dadurch vor anderen posttranskriptionellen Modulationmechanismen, die erst im Cytosol stattfinden.

Die genauen Unterschiede der einzelnen Isoformen und ihre spezielle Bedeutung ist noch nicht vollständig geklärt, aber jede von ihnen kann die RNA-Stabilität beeinflussen. Für die Stabilisierung zeigten sich unterschiedliche Stärken der Isoformen mit folgender Rangordnung $p37 \geq p42 > p45 \geq p40$ [Xu et al., 2001]. Weiter konnten unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen ARE Klassen gefunden werden, somit werden bevorzugt ARE der Klasse II gebunden ($ARE II > ARE I \geq ARE$

III). Außerdem wurde eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der AUUUA-Wiederholungen und der Affinität zu AREs beschrieben.

Somit ist AUF1 ein wichtiges Protein bei der Regulation der mRNA [DeMaria, Brewer, 1996] in der Zelle und hat dadurch einen entscheidenden Einfluss auf die Proteinsynthese. Jede Veränderung der Potenz oder Zusammensetzung der AUF1-Proteinmenge kann eine Wirkung auf Zellzyklus, Wachstum und auch unphysiologisches Wachstum haben.

Dies kann auf der direkten Wirkungsebene des Proteins, also der mRNA-Bindung mit nachfolgender Stabilisierung oder Destabilisierung erfolgen. Aber auch ein gestörter Proteinumsatz durch unterschiedliches Ubiquitinierungsverhalten der einzelnen Isoformen und so veränderten Halbwertszeiten, hätte Folgen für die mRNA-Ausstattung der Zelle.

1.6 Regulation der AUF1-Expression durch Stimulantien

Für die Stimationsversuche der Schilddrüsenzelllinien wurden fünf Stimulantien eingesetzt, die einen Einfluss auf Schilddrüsenzellen ausüben. Diese fünf Stimulantien werden im Folgenden kurz vorgestellt.

EGF steht für Epidermal Growth Factor und ist ein Protein, das bei der Initiation der Mitose als Signalmolekül auftritt. Die Rezeptorbindung erfolgt extrazellulär an der Zellmembran und wird durch einen sieben-transmembran-helicalen Rezeptor der HER/ErbB-Familie mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität vermittelt. Durch Autophosphorylierung erfolgt ein Austausch von GDP zu GTP und es kommt zu einer Aktivierung eines RAS-Proteins, das im Stande ist Proteinkinasen zu aktivieren, im Speziellen die Proteinkinase C. Somit kann EGF das Zellwachstum stimulieren und den apoptotischen Zelltod verhindern.

Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) ist ein Phorbolster. Als lipophile Substanz ist es in der Lage die Zellmembran zu durchdringen. Im Cytosol kann es direkt die Proteinkinase-C stimulieren [Gerard et al., 1986]. Somit umgeht es die physiologische Signaltransduktion des G-Protein gekoppelten Rezeptors und des second Messengers Diacylglycerin, welcher normalerweise die membrangebundene Proteinkinase-C aktiviert. Diese wiederum kann Serin- und Threoninreste in zahlreichen Zielproteine phosphorylieren. Somit wird unter anderem die NADPH-

Oxidase aktiviert [Seifert *et al.*, 1991; Suzuki, Lehrer, 1980; Castagna *et al.*, 1982] und die Sauerstoffradikalbildung in der Zelle beeinflusst.

Den wohl größten Einfluss auf das Wachstum der Schilddrüse und auch auf Schilddrüsentumore hat das schilddrüsenstimulierende Hormon TSH (Thyreostimulierendes Hormon). Die Wirkung auf die verschiedenen Entitäten wird in der Literatur kontrovers diskutiert, aber in in-vitro-Experimenten zeigte sich TSH eindeutig als Wachstumsfaktor in verschiedenen Karzinomzelllinien mehrerer Säugetiere [Wynford-Thomas, 1994]. TSH wird normalerweise in den basophilen Betazellen des Hypophysenvorderlappens gebildet und ist ein Proteohormon, das die Funktion der Schilddrüse beeinflusst (Iodeinbau, Hormonsekretion, Follikelwachstum). Die TSH-Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt, die intrazellulär eine cAMP-Erhöhung hervorrufen. Durch diese Erhöhung wird die Proteinkinase A aktiviert, die somit den Effekt des TSH umsetzt.

Eine direkte Aktivierung der Adenylatcyclase und somit eine cAMP-Erhöhung wird durch Forskolin ermöglicht. Dadurch hat Forskolin auch eine Wirkung auf die Proteinkinase A und auf deren Zielproteine. Als Pharmakon wird es bereits erfolgreich zur Vasodilatation und zur Drucksenkung bei Glaukomen eingesetzt.

Als letztes Stimulans wurde Insulin eingesetzt. Es ist ein anaboles Hormon, das seine Hauptwirkung in Leber-, Muskel- und Fettgewebe entfaltet und so hauptverantwortlich für die Regulation des Glucosehaushalts im Körper ist. Insulin hat aber auch einen genomischen Effekt, der langfristig dem Wachstum des Organismus dient. An der einzelnen Zelle fördert es die Aufnahme von Aminosäuren und wirkt so stimulierend auf den gesamten Proteinstoffwechsel. Der Insulinrezeptor wird in nahezu allen Zellen exprimiert. Seine Anzahl reicht von wenigen hundert auf Erythrozyten bis zu mehreren hunderttausend auf Lipozyten und Hepatozyten. Der membranständige Rezeptor weist eine Tyrosinkinase-Aktivität auf, besitzt zwei extrazelluläre α -Untereinheiten, die Insulin binden können und zwei transmembrane β -Untereinheiten, die mit einer ATP-Bindungsstelle und der Tyrosinkinase-Aktivität ausgestattet sind. Die drei wichtigsten durch Insulin ausgelösten Signalwege sind der Weg über Phospholipase und Inositoltriphosphat, über die MAP-Kinase und über die Phosphatidylinosit-3-Kinase. Am wichtigsten für die Schilddrüse ist der Weg über Phospholipase, der zu einer Aktivierung der Proteinkinase C führt und so das

Aktivitätslevel und den Stoffumsatz steigert. Aber auch der dritte Weg über die Proteinkinase B könnte einen Einfluss haben.

Somit wurden drei Stimulantien verwendet, die extrazellulär an Rezeptoren binden und deren Wirkung hauptsächlich über die Proteinkinasen A und C umgesetzt wird. Weiter wurden zwei Stimulantien (PMA und Forskolin) eingesetzt, die die Zellmembran passieren können und so direkt ihre Wirkung an den Proteinkinasen A und C entfalten. Des Weiteren lässt sich eine vorwiegend katabole Wirkung (z.B. von PMA) mit einer vorwiegend anabolen Stimulation (Insulin) vergleichen.

1.7 Zielsetzung

Wie in der Einleitung beschrieben ist AUF1 wichtig für physiologisches Wachstum und die Differenzierung von Geweben. Somit stellt sich die Frage nach dem AUF1-Verhalten und seiner Rolle in unphysiologischen Gewebeszuständen.

Ziel dieser Arbeit war es, das Protein AUF1 in der Schilddrüse, speziell in verschiedenen Entartungszuständen zu untersuchen. Da es hierzu bisher keine Ergebnisse in den unterschiedlichen Schilddrüsengeweben gibt und auch die Eigenschaften der einzelnen AUF1-Isoformen noch nicht ganz verstanden sind, stand die Verteilung der Isoformen zueinander und die Gesamtexpression des Proteins im Vordergrund. Dies sollte sowohl an Schilddrüsentumorzelllinien aber auch an Schilddrüsengeweben untersucht werden. Weiter sollte in den Schilddrüsentumorzelllinien untersucht werden, ob sich durch verschiedene Stimulantien und deren Signaltransduktion die AUF1-Ausstattung der Zellen beeinflussen lässt.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Geräte und Hilfsmittel

2.1.1 Chemikalien (alphabetische Reihenfolge)

Chemikalien	Hersteller, Ort, Land
2-Mercapto-Ethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Antibiotika (Penicillin 10000U/ml, Streptomycin 10mg/ml)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Acrylamid/Bisacrylamid 30%	ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
DMEM/F12-Medium	Gibco, Paisley, Scotland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Essigsäure 100%	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco, Paisley, Scotland
Glycerol	Universitätsapotheke, Halle, Deutschland
Glycin	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Magermilchpulver	TSI GmbH & Co. KG, Zeven, Deutschland
Methanol absolut	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden

Phosphat Buffered Saline (PBS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Salzsäure (HCl)	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Triton x-100	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin	Gibco, Paisley, Scotland
Tween20	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Universitätsapotheke, Halle, Deutschland

2.1.2 Geräte (alphabetische Reihenfolge)

Geräte	Hersteller, Ort, Land
Brutschrank Cytoperm 2	Heraeus, Gera, Deutschland
Elektronik-Rührer Poly 15	VARIOMAG, München, Deutschland
Kodak Image Station 440	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Kühler WK 230	Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg, Deutschland
Kühlzentrifuge Biofuge 28RS	Heraeus, Gera, Deutschland
Mikro-Dismembrator S	Braun Biotech, Melsungen, Deutschland
Mikroskop Axioplan 2	ZEISS, Jena, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	ZEISS, Jena, Deutschland
Mikrotom HM 560	MICROM GmbH, Walldorf, Deutschland
Minigelkammer Protean II	Bio-Rad, München, Deutschland
Mixer Maxi Mix I	Thermolyne Coporation, Iowa, USA

Pipette Pipetus	Hirschman Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipetten Multipipette plus	Eppendorf-Netheter-Hinz, Hamburg, Deutschland
Power-Pac 300	Bio-Rad, München, Deutschland
Reinraumbank HS 12	Hereaus, Gera, Deutschland
Schüttler	GFL, Burgwedel, Deutschland
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Trans-Blot	Bio-Rad, München, Deutschland
UV-Visualspectrometer 1602	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Waage SP32 O2 S	Sartorius Basic, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge Galaxy 7D	VWR International, Darmstadt, Deutschland

2.1.3 Hilfsmittel und Antikörper (alphabetische Reihenfolge)

Hilfsmittel	Hersteller, Ort, Land
Aquatex Eindeckmittel	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Antikörperverdünnungslösung	Dako, Glostrup, Dänemark
ChemMate Detection Kit	Dako, Glostrup, Dänemark
Deckgläser 24x50mm	Marienfeld, Land-Königshofen, Deutschland
ECL Western Blotting Substrate	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Einbettmedium	Jung, Nussloch, Deutschland
Eppendorf-Röhrchen	Eppendorf-Netheter-Hinz, Hamburg, Deutschland
Hyperfilm-MP	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Objektträger SuperFrost plus	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Protease-Inhibitor-Cocktail (cOmplete Mini)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Proteinvermessungskit (2-D Quant Kit)	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
PVDF-Transfermembran	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Rainbow Molecular Weight Marker	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Whatman Blotting Papier	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zellkulturflaschen (25cm ² , 75cm ² , 175cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	TPP, Schweiz

Antikörper	Zielspezies	Ursprungsspezies	Hersteller
Anti-AUF1-IgG	Human	Hase	Upstate
Anti-β-Actin-IgG	Human	Maus	Sigma
Anti-GAPDH-IgG	Human	Maus	Ambion
Anti-Hase-IgG-HRP	Hase	Ziege	santa cruz biotechnology
Anti-Maus-IgG-HRP	Maus	Ziege	santa cruz biotechnology

2.2 Schilddrüsenzelllinien und Patientengewebe

Alle untersuchten Gewebe wurden von Patienten im Rahmen einer Operation in der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entnommen. Jede dieser Operationen war medizinisch notwendig und die Patienten erklärten sich mit einer wissenschaftlichen Untersuchung der Gewebe einverstanden. Die durchgeführten Untersuchungen an menschlichem Gewebe wurden durch die Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle genehmigt.

Direkt nach Entnahme der Gewebe wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert. Durch das Pathologische Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wurden alle Proben begutachtet und klassifiziert.

2.2.1 Patientengewebe für die Westernblotuntersuchung

Auf Proteinebene wurden sechs Gewebetypen untersucht. Tabelle 1 zeigt Art und Anzahl der untersuchten Gewebe.

Gewebetyp	PTC	UTC	FTC	Adenom	Struma	Normalgewebe
Anzahl	13	10	7	10	10	4

Tabelle 1: Entitäten mit der jeweiligen Anzahl der im Westernblot untersuchten Gewebe

Es wurden nur Gewebe verwendet, die klar einer Entität zuzuordnen waren, um Ergebnisse zu erhalten, die repräsentativ für die jeweilige Differenzierung sind. Die Normalgewebe sind Schilddrüsengewebe, die während einer Operation an der Nebenschilddrüse entnommen wurden und als normales Schilddrüsengewebe klassifiziert wurden. Es wurden keine Randbereiche oder gut differenzierte Bereiche aus Schilddrüsentumoren verwendet, um möglichst normales Gewebe darstellen zu können und auch Einflüsse, wie das Mikromilieu eines Tumors, ausschließen zu können.

2.2.2 Patientengewebe für Immunhistochemie

Wie in der Westernblot-Analyse wurden mit der Immunhistochemie sechs Gewebetypen untersucht (Tab. 2).

Gewebetyp	PTC	UTC	FTC	Adenom	Struma	Normalgewebe
Anzahl	10	10	10	10	10	1

Tabelle 2: Entitäten mit der jeweiligen Anzahl der immunhistochemisch untersuchten Gewebe

Es wurde nur ein Normalgewebe untersucht und so exemplarisch den benignen und malignen Gewebetypen gegenübergestellt, um eine Orientierung geben zu können.

2.2.3 Schilddrüsenzelllinien

In dieser Arbeit wurden drei Schilddrüsenzelllinien untersucht, die beispielhaft die drei malignen Tumorentitäten, die sich aus Schilddrüsenepithelzellen entwickeln können, repräsentieren.

Die Zelllinie FTC-133 stammt aus einer Lymphknotenmetastase eines metastasierten follikulärem Schilddrüsenkarzinom eines 42-jährigen Patienten. Die Zellen tragen intakte EGF- und TSH- Rezeptoren und sind fähig Thyreoglobulin zu bilden [Goretzki *et al.*, 1990].

Aus einem undifferenzierten Schilddrüsenkarzinom einer 78-jährigen Patientin wurde die Zelllinie UTC 8505C isoliert. Der Primärtumor wies einen hohen Anteil undifferenzierter Zellen aber auch papilläre Strukturen auf [Ito *et al.*, 1994].

Die Zelllinie B-CPAP wurde aus dem Primärtumor eines metastasierenden papillären Schilddrüsenkarzinoms einer 76-jährigen Patientin gewonnen [Fabien *et al.*, 1994]. In den Zellen lassen sich Thyreoglobulin, die Proteine S100 und NSE, sowie eine Mutation des p53-Proteins nachweisen [Fabien *et al.*, 1994].

2.3 Zellkultivierung

Alle Arbeiten mit Zellkulturen fanden in einer Reinraumbank statt. Hier sorgten die vertikale Luftströmung und sorgfältiges Arbeiten dafür, dass Kontaminierungen vermieden wurden. Ebenso wurde auf steriles Arbeiten geachtet, was Hände- und Arbeitsplatzdesinfektion mit 70% Ethanol bei jedem Arbeitsgang und das Verwenden von sterilen oder desinfizierten Materialien mit einschließt.

Für alle drei Zelllinien wurde das Nährmedium DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's Minimum Essential Medium) mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet. Durch den Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FCS) erhielten die Zellen zusätzlich wichtige Stoffe, wie z.B. Hormone und Wachstumsfaktoren [Lindl, Bauer, 1989]. Vor Gebrauch wurde das FCS bei 56°C für 30min hitzeinaktiviert. In einem sterilen Arbeitsschritt wurden zwei Antibiotika zupipettiert (pro Liter Medium 5000U Penicillin und 5mg Streptomycin), um einen bakteriellen Befall zu vermeiden.

Da die Zelllinien in flüssigem Stickstoff lagerten, mussten sie zur Kultivierung aufgetaut werden. Dies erfolgte mittels eines auf 37°C erwärmten Mediums. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in Medium

resuspendiert. Somit wurden die Zellen vom Dimethylsulfoxid (DMSO), das für die Kryokonservierung verwendet wurde, getrennt. Um die Zellkulturflaschen mit einer definierten Zellzahl beimpfen zu können, wurde die Zellzahl bestimmt. Hierzu wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet [Lindl et Bauer, 1989]. Aus der Zelldichte und der Größe der Zellkulturflasche ergab sich das zu pipettierende Volumen, mit dem Zielwert von ca. $6,6 \times 10^3$ Zellen/ml/cm² Flaschenboden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, einer 95%-wasserdampf-gesättigten Atmosphäre und einer CO₂-Konzentration von 5%. Je nach Wachstum und Verbrauch an Nährstoffen durch die Zellen, wurde das Medium in entsprechenden Abständen gewechselt.

2.3.1 Passagierung

Nach Ausbildung eines konfluenten Mono-Layers wurden die Zellen gesplittet. Um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen, wurden sie erst mit HBSS gewaschen und je nach Flaschengröße mit einer definierten Menge an Trypsin versetzt. Den gelösten Zellen wurde Vollmedium zugesetzt und anschließend wurde die Suspension abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in Medium resuspendiert. Nach erneuter Zählung der Zellen wurde eine neue Zellkulturflasche mit entsprechender Zellzahl beimpft. Dieser Vorgang wurde bis zur vierten Passage wiederholt und erst diese Zellen wurden für die Stimulationsversuche verwendet. So konnte eine Beeinflussung durch die Kryokonservierung vermieden werden.

2.3.2 Stimulationsversuche

Tabelle 3 zeigt die Stimulantien und die für die Versuche eingesetzten Konzentrationen.

Stimulans	EGF	PMA	TSH	Forskolin	Insulin
Konzentration	5ng/ml	10ng/ml	100µU/ml	10 ⁻⁵ M	5µg/ml

Tabelle 3: Verwendete Stimulantien und deren Konzentration

Die entsprechende Anzahl an benötigten Kulturflaschen wurde mit den Zellen beimpft und nach Bildung eines 70%-ig konfluenten Zellen-Mono-Layer wurden die

Zellen mit Leermedium (ohne fötales Kälberserum) für 24 Stunden inkubiert. Danach erfolgte eine Stimulation über 24, 48 und 72 Stunden.

2.3.3 Proteingewinnung aus Zelllinien

Nach der Stimulation wurden die Zellen abzentrifugiert und von überschüssigem Medium befreit. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Proben auf Eis gekühlt, was neben dem zugesetzten Proteinaseinhibitor (cOmplete Mini®) den Abbau der Proteine verhindert. Das erhaltene Pellet wurde in PBS-Puffer gelöst und erneut abzentrifugiert. Jetzt erfolgte eine Resuspension in einem Proteinextraktionspuffer (Tabelle 4).

Natriumchlorid	150mM
Tris-HCl pH 7,5	20mM
EDTA pH 8,0	0,5mM
EDTA pH 7,5	0,5mM
Triton-100	0,5%
H ₂ O	

Tabelle 4: Zusammensetzung des Proteinextraktionspuffers

Die Suspension wurde bei 4°C und 16.000g für 45min zentrifugiert. Dabei reicherten sich die Proteine in der Interphase an, die in ein Eppendorf-Röhrchen überführt wurde. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.4 Proteingewinnung aus Patientengewebe

Die Patientengewebe wurden wie in Abschnitt 2.2 beschrieben in Stickstoff gelagert. Vor der Lösung im Proteinextraktionspuffer mussten die Gewebe homogenisiert werden. Während aller Arbeitsschritte wurden die Gewebe und alle verwendeten Utensilien in flüssigem Stickstoff gekühlt, um ein An- oder Auftauen zu verhindern. Die gefrorenen Gewebestücke wurden zusammen mit einer teflonbeschichteten Stahlkugel in ein Teflongefäß gegeben und mit einer Frequenz von 2500rpm für zwei

mal 20sec horizontal in einem Mikro-Dismembrator geschüttelt. Durch die mechanische Zerkleinerung wurde aus den Gewebsblöcken ein homogenes Pulver hergestellt. Dieses wurde im Proteinextraktionspuffer gelöst und das Protein präpariert (siehe Punkt 2.3.3).

2.5 Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde die Methode nach Bradford (1976) verwendet. Hierfür wurde der 2-D Quant Kit eingesetzt. 20µl jeder Probe wurden nach Herstellerangaben vorgeschrieben vorbereitet und anschließend bei 480nm in einem UV-Spektrometer vermessen. Für die Ermittlung der Proteinkonzentration diente eine Eichkurve, die mit definierten Konzentrationen aus Rinderserumalbumin (BSA) hergestellt wurde. Es wurden nur Eichkurven verwendet, die einen Fehler (ermittelt durch Lineare Regression) von unter einem Prozent aufwiesen. Außerdem wurden für jede Probe zwei Ansätze hergestellt und somit eine Doppelbestimmung durchgeführt.

2.6 Westernblot

Beim Westernblot werden Proteine auf spezielle Membranen transferiert um sie mit immunohistochemischen Methoden detektieren zu können [Towbin et al., 1979; Towbin et al., 1989]. Dazu wird das Gesamtprotein der Zellen mittels Gelelektrophorese aufgetrennt [Laemmli, 1970]. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid-Membran) transferiert und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

2.6.1 Herstellen der Elektrophoresegele (SDS-Page)

Die eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) trennt Proteine der Größe nach auf. Hierbei erfolgt die Trennung der Proteine durch eine Gelmatrix, die aus Acrylamid und Bisacrylamid besteht. Acrylamid bildet durch Anwesenheit freier Radikale in einer Kettenreaktion lange Polymere, Bisacrylamid vernetzt die Polymere. Beschleunigend wirken hier TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und APS (Ammoniumperoxodisulfat), wobei APS als Radikalbildner fungiert. Das Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat), das im Überschuss zugefügt wird, wird von den Proteinen gebunden, die so negativ geladen werden und im

angelegten elektrischen Feld nach ihrer Molmasse aufgetrennt werden [Sambrook, Gething, 1989].

Die Gele bestanden aus zwei horizontal getrennten verschiedenen Schichten, dem Sammel- und dem Trenngel. Das Sammelgel besitzt größere Poren und einen anderen pH-Wert als das Trenngel, wodurch die Proteine schneller und ohne Auftrennung in Banden wandern. Beim Übergang in das Trenngel wird die Laufgeschwindigkeit drastisch reduziert und es erfolgt die Auftrennung in einzelne Banden abhängig von der Größe der Proteine.

Die Zusammensetzungen der Gele sind in Tabelle 5 dargestellt. Aqua bidest., Tris-HCl, Acrylamid und SDS wurden zusammenpipettiert und für 15min entgast um Luftbläschen zu vermeiden. Danach wurden TEMED und das frisch hergestellte APS zugegeben und das Trenngel in die vorbereitete Apparatur gegossen. Nach dem Befüllen wird das Trenngel vorsichtig mit Aqua bidest. überschichtet und nach einer Stunde war die Matrix vollständig polymerisiert.

	5% Sammelgel	10% Trenngel
Aqua bidest.	1,20ml	4,00ml
Tris-HCl pH 6,8/pH 8,8 1,5M	0,75ml	2,50ml
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	0,39ml	3,30ml
SDS 10%	0,03ml	0,10ml
APS 10%	0,03ml	0,10ml
TEMED 0,05%	0,005ml	0,01ml

Tabelle 5: Zusammensetzungen der Gele

Entsprechend wurde auf gleiche Weise das Sammelgel vorbereitet und nach Entfernen des Aqua bidests. über das Trenngel gegossen. Im Sammelgel wurden durch einen Kamm die Probestaschen gebildet. Nach einer weiteren halben Stunde war das Sammelgel polymerisiert und der Kamm wurde entfernt.

2.6.2 Probenvorbereitung und Gelelektrophorese

Es wurden 20µg Gesamtprotein jeder Probe aufgetragen. Zuvor wurden die Proben im Verhältnis eins zu eins mit einem Ladepuffer gemischt (Tab. 6).

Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS	4%
Glycerol	20%
Bromphenol	2%
2-Mercapto-Ethanol	10%
H ₂ O	

Tabelle 6: Stammlösung für den Ladepuffer nach Laemmli (1970), die Stammlösung wurde im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest. vermischt, um den Laemmli-Loading-Puffer zu erhalten

Die Proben wurden für 10min auf 95°C erhitzt und anschließend auf Eis gelagert. Nach Aufbau der Elektrophoresekammer konnten die Proben aufgetragen werden. In jedem Gel lief ein Massenmarker (Rainbowmarker) als Größenstandard mit. Die Elektrophoresekammer (Abb. 4) wurde mit Laufpuffer (50mM TRIS, 384mM Glycin, 0,1% SDS) befüllt.

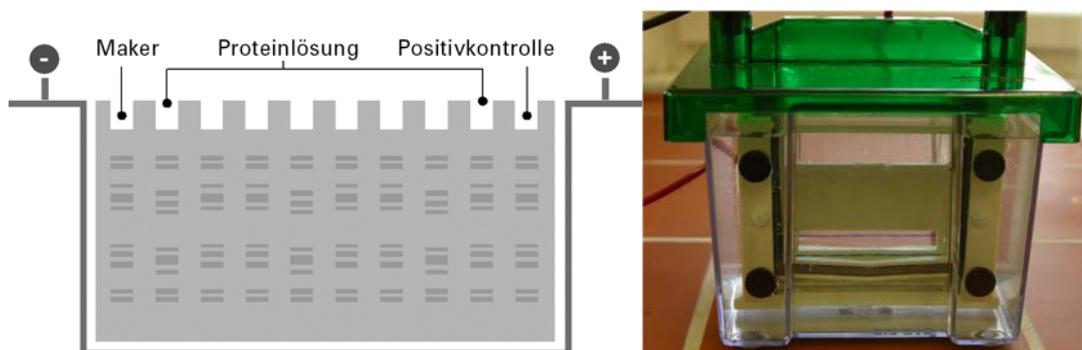


Abbildung 4: links: schematische Darstellung einer Elektrophorese, rechts: Bild einer Elektrophoreseapparatur

Jetzt wurde ein elektrisches Feld mit einer Stromstärke von 25mA für 15min angelegt und danach auf 40mA erhöht. Nach circa zwei Stunden hatte die Bromphenol-Lauffront die untere Kante des Gels erreicht und die Elektrophorese wurde gestoppt.

2.6.3 Semidry-Blotting

Um die in der Elektrophorese getrennten Proteine mit einem Antikörper nachzuweisen, mussten die Proteine zunächst aus dem Gel auf eine geeignete Matrix überführt werden. Als Träger wurde eine PVDF-Membran gewählt. Der Transfer erfolgt auf elektrophoretischem Weg auf die Membranoberfläche, mit der die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen interagieren. Bei diesem Vorgang wurde das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen, die Anordnung der Proteine im Gel blieb dabei erhalten. Daher konnten die Proteine teilweise renaturieren und ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wiedererlangen. Für den Transfer wurde ein sandwichartiger Aufbau, wie in Abbildung 5 dargestellt, verwendet. Vor dem Aufbau wurden die Membranen in Methanol getränkt und die Blotkammer wurde mit einem Transferpuffer (20% Methanol, 50mM TRIS, 380mM Glycin) befüllt.

Danach erfolgt bei 6°C und 20V der Transfer über acht Stunden.

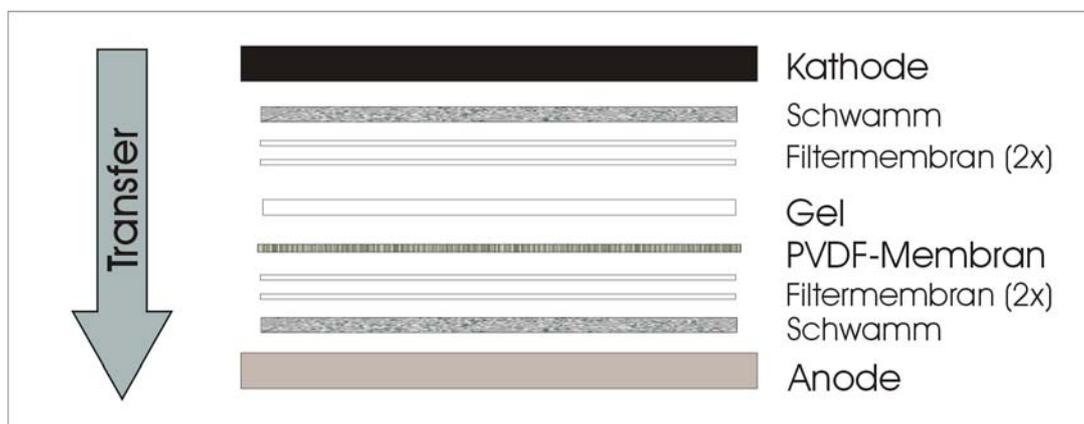
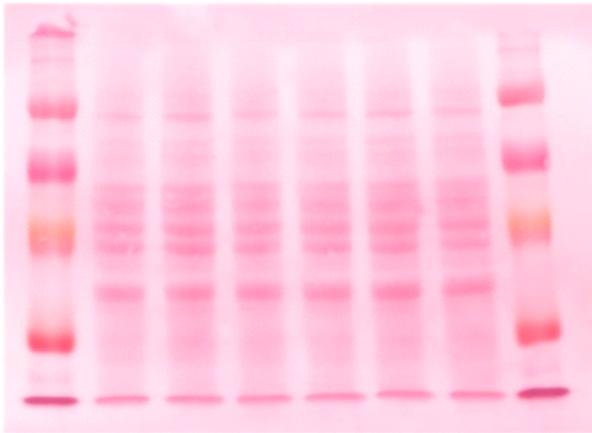


Abbildung 5: Schichtaufbau für das Semidry-Blotting

2.6.4 Ponceau S Färbung

Nach erfolgtem Blotten der Proteine erfolgte eine reversible Färbung mit Ponceau S [Salinovich, Montelaro, 1986]. Somit lässt sich überprüfen ob sowohl die Auftrennung als auch der Transfer der Proteine erfolgreich war. Weiter kann die geladene Menge je

Slot beurteilt werden. Nachfolgend ist die Zusammensetzung der Lösung beschrieben und ein Beispiel dargestellt (Abb. 6).



Färbelösung:

Ponceau S 6mM

Essigsäure 1%

gelöst in Aqua bidest.

Abbildung 6: Beispiel für eine PVDF-Membran nach Ponceau S Färbung, rechts und links ist der Massenmarker aufgetragen, in den mittleren Slots sind die Proben der Gesamtproteine zu sehen.

Es erfolgte eine Färbung über fünf Minuten, anschließend eine Entfärbung in Aqua bidest. bis klare Bandenmuster zu erkennen waren. Zur Dokumentation wurden die Membranen eingescannt.

Danach wurden die Membranen mit Aqua bidest. vollständig entfärbt und bei 4°C gelagert.

2.6.5 Detektion durch Antikörper

Die Lagerung der Membranen und alle Waschschrte erfolgten in TBS/T (40mM Tris, 140mM NaCl, 0,1% Tween20, pH 7,5), die Antikörper wurden in TBS gelöst. Um die freien Bindungsstellen auf den Membranen zu sättigen wurden sie für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 5% Magermilchpulver inkubiert. Es folgten drei Waschschrte für jeweils zehn Minuten. Hieran knüpfte sich die Inkubation mit dem spezifischen Primär-Antikörper an. Dieser bindet an allen vier Isoformen von AUF1 und wurde im Verhältnis 1:25.000 eingesetzt. Zuerst erfolgte die Inkubation auf dem Schüttler für 30min bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C. Um überschüssige und nicht gebundene Antikörper zu entfernen, folgten drei Waschschrte für je 15min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Eine

zweite Antikörperlösung (sekundär Antikörper im Verhältnis 1:50.000) wurde auf die Membran gegeben, deren Epitope spezifisch gegen bestimmte Bereiche des ersten Antikörpers gerichtet sind. Auch hier wurde erst auf dem Schüttler bei Raumtemperatur für 30min und anschließend bei 4°C über Nacht inkubiert. Drei nachfolgende Waschrinne dienten erneut zum Entfernen von ungebundenen Antikörpern und wurden für jeweils 15min bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Visualisierung wurde die an den zweiten Antikörper gebundene Peroxidase genutzt, wie in Abschnitt 2.6.6 beschrieben.

Für den Nachweis der geladenen Proteinmenge wurden die Membranen auf β -Actin oder GAPDH untersucht. Für eine neue Antikörperdetektion mussten erst die an der Membran gebundenen Antikörper entfernt werden. Hierzu wurden die Membranen einem Re-Blot und anschließend drei Waschrinne für je 10min unterzogen. Für den Re-Blot wurde eine Stripping-Lösung (0,2 M Glycin-HCL, 0,05% Tween20, pH-Wert 2,5) verwendet. In dieser wurden die Membranen für 20min inkubiert. Danach war eine erneute Antikörperdetektion möglich. Die Schritte des Blockens, des Waschens und der Antikörperbehandlung erfolgten wie oben beschrieben. Jedoch wurden die Inkubationen mit dem Primär- und Sekundär- Antikörper bei Raumtemperatur auf dem Schüttler über zwei Stunden durchgeführt.

2.6.6 Chemilumineszenzreaktion

Um den Komplex aus Zielprotein und Antikörpern visualisieren zu können, wurde ein ECL-Plus-Detektions-Kit eingesetzt und so die Enhanced Chemiluminescence (ECL) benutzt. Hierbei wandelt die am sekundären Antikörper gebundene Peroxidase („horseradish peroxidase“, HRP) ein Substrat in seine oxidierte Form um, wobei es zu einer Lichtemission kommt [Durrant, Fowler, 1994]. Diese kann auf speziellen Filmen sichtbar gemacht werden. Die Peroxidase oxidiert das Substrat Lumigen PS-3 zu einem Acridiniumester. Durch Reaktion mit Peroxiden entsteht eine intensive Chemilumineszenz mit einem Emissionsmaximum bei circa 430nm (Abb. 7).

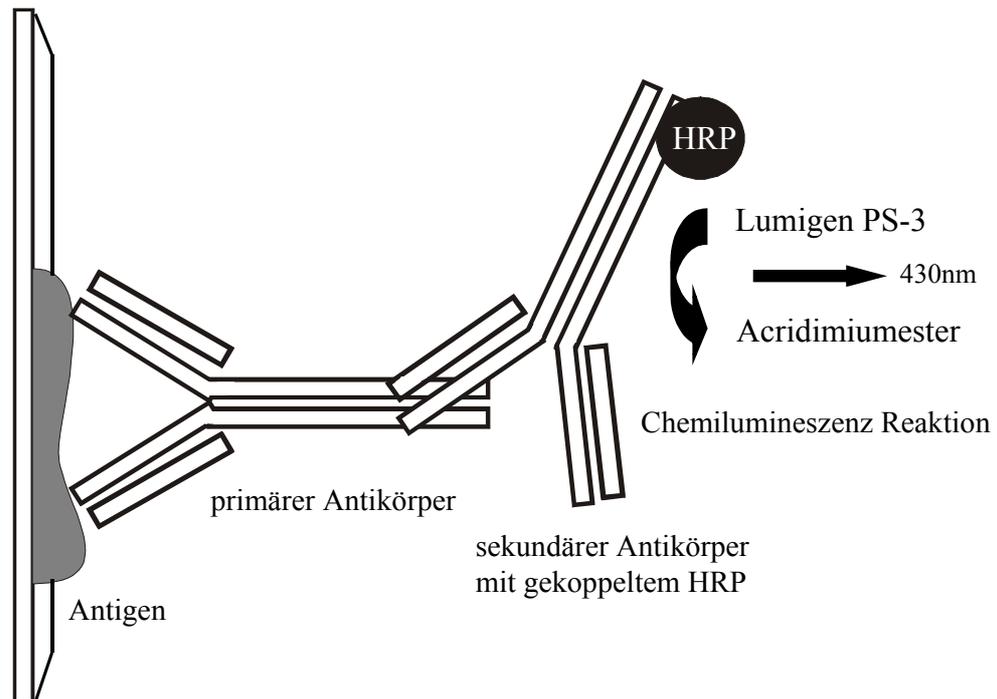


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Antikörperdetektion und der Chemilumineszenz

Die Reaktion wurde durch die Exposition eines Autoradiographiefilms (Hyperfilm ECL) sichtbar gemacht. Die Expositionszeit lag zwischen einer und drei Minuten. Anschließend wurde der Hyperfilm entwickelt und fixiert. Die Exposition und Entwicklung des Filmes fanden in einer Dunkelkammer statt.

2.6.7 Auswertung

Für die Auswertung der auf den Filmen sichtbaren Banden wurde das Computerprogramm Kodak Digital Science 1D 3.02 verwendet. Hierzu wurden die Banden vermessen, mit dem entsprechenden Normalisierungsmarker zur Kontrolle abgeglichen und als absolute und relative Werte dokumentiert. Durch den automatischen Abgleich zum Hintergrund durch das Programm sind alle erhobenen Werte als nachgewiesene Antikörperbindungen zu sehen und stehen somit indirekt für die detektierten Proteine.

Als Kontrolle für die Stimulationsversuche wurde jeweils eine unstimulierte Probe verwendet. Für die Gewebeproben wurde als Positivkontrolle eine Zelllinienprobe der FTC-133 Zelllinie eingesetzt. In Abbildung 8 ist das Ergebnis eines Westernblots nach Antikörperfärbung als Beispiel dargestellt.

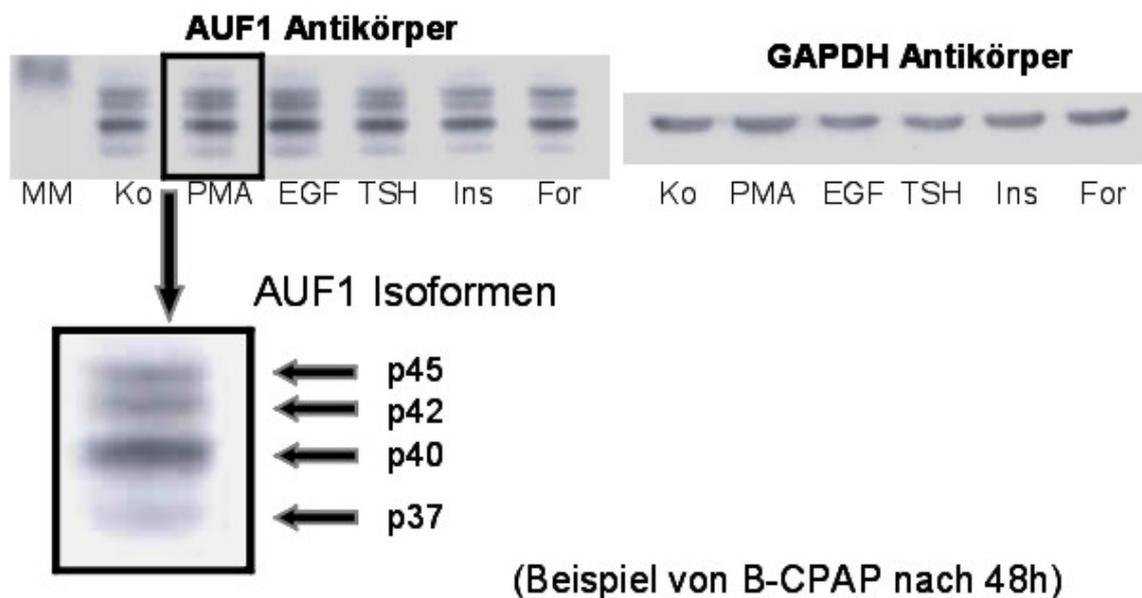


Abbildung 8: Beispiel einer Antikörperfärbung nach Westernblot. Zu sehen sind die vier detektierten Isoformbanden und die Bande des Normalisierungsmarkers, sowie des Massenmarker (MM), gefolgt von der Kontrollprobe und den stimulierten Proben.

2.7 Herstellung von Gefrierschnitten aus Patientengewebe

Die in Stickstoff gelagerten Patientengewebe wurden in einem Mikrotom bei -20°C geschnitten, um ein Auftauen und Austrocknen zu verhindern. Es wurden $5\mu\text{m}$ dicke Schnitte hergestellt. Hierzu wurden die Gewebestücke in das Eindeckmedium für Gefrierschnitte eingebettet und in das Mikrotom eingespannt. Die hergestellten Schnitte wurden mit Superfrost Objektträgern aufgenommen. Anschließend wurden die Objektträger bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.7.1 Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten

Um bei der Färbung ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden wurden alle Arbeitsschritte in einer feuchten Kammer durchgeführt. Zuerst wurden die Schnitte in eiskaltem Methanol und 3%igem Wasserstoffperoxid (Verhältnis 4 : 1) fixiert und von Fett befreit. Danach erfolgten drei Waschschrte mit PBS (Phosphat Buffered Saline: 1,4 M Natriumchlorid; 26,9mM Kaliumchlorid; 42,7mM Dinatriumhydrogenphosphat; 11,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat) und eine Inkubation in PBS für fünf Minuten. Für das Blocken der unspezifischen Bindungen wurde der Primärantikörper mit einem Verdünnungspuffer der Firma Dako verdünnt. Der Antikörper wurde im

Verhältnis 1:200 verwendet und es erfolgte eine Inkubation über zwölf Stunden bei 4°C. Es wurde immer eine Negativkontrolle mitgeführt, die in diesem Arbeitsschritt mit PBS anstatt des Antikörpers inkubiert wurde. Nach der Inkubation erfolgten drei Waschschrte mit PBS. Für die Visualisierung der Antikörperbindung wurde die LSAB-Methode mit Hilfe des ChemMate Detection Kits der Firma Dako verwendet. Die Schnitte wurden mit einem biotinylierten sekundären Antikörper als Brückenantikörper für 30min inkubiert. Anschließend wurde mit PBS gewaschen und für 30min mit Streptavidin-Peroxidase inkubiert. Ein erneuter Waschschrte entfernte alle nicht gebundenen Peroxidasen. Anschließend wurde das Substrat, eine Lösung aus Diaminobenzidin und dem wasserstoffperoxidhaltigem HRP Substrat, zugesetzt. Somit wurden die Zielantigene, also die AUF1 Isoformen, mit einer Braunfärbung detektiert. Überschüssiges Substrat wurde mit Aqua bidest. entfernt. Als letzter Färbeschritt wurde für zwei Minuten eine Hämalaunfärbung durchgeführt, um eine nukleäre Blaufärbung zu erreichen. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit Wasser und Aqua bidest. gespült. Jeder Objektträger wurde mit Aquatex und einem Deckgläschen eingedeckt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C und für die Auswertung der Schnitte wurde ein Axio Plan 2 Mikroskop benutzt.

2.7.2 Auswertung

Die Schnitte wurden anhand des SI-Index ausgewertet, wobei SI für stärkste Intensität steht. Beurteilt werden zum Einen die Farbintensität der Braunfärbung des Schnittes mit einem Punktwert von 0 für negativ bis 3 für stark gefärbt und zum Anderen die Anzahl der Zellen, die die stärkste Intensität aufweisen. Auch hierfür werden Punkte vergeben von 0 für 0-10% der Zellen bis 4 für 80-100% der Zellen. Damit erhält jeder Schnitt zwei Punktwerte die miteinander multipliziert werden. Es sind zwischen 0 und 12 Punkte möglich, die, wie in Tabelle 7 dargestellt, interpretiert werden.

Erreichte Punktzahl	Färbegrad der Gewebe	Symbol
0-2	Negativ	∅
3-5	Schwach	(+)
6-7	Mäßig	+
8-12	Stark	++

Tabelle 7: Auswertung der Schnitte anhand des SI-Index

Es wurde stets der ganze Schnitt betrachtet und zwei repräsentative Bereiche ausgewählt und fotografiert.

2.7.3 Statistische Methoden

Verschiedene Gruppen (z.B. unterschiedliche Entitäten) wurden statistisch mittels t-Test und Mann-Whitney-Test miteinander verglichen und die Ergebnisse auf Signifikanz geprüft. Eine Signifikanz lag bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ vor. In der graphischen Darstellung wurde auf den für Mann-Whitney-Test typischen Box-Blot verzichtet. Dieser Test wurde lediglich durchgeführt, um die Normalverteilung der Proben und somit die Aussage der gefundenen Signifikanzen zu bestätigen.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Schilddrüsenzelllinien

In den Schilddrüsenzelllinien wurde die Expression sowohl in unbehandelten als auch in stimulierten Zellen untersucht. Somit ließ sich zu drei verschiedenen Zeitpunkten die Isoformenexpression unbehandelter Zellen festhalten. Die Stimulation wurde über einen Zeitraum von 72h beobachtet.

3.1.1 AUF1 in den Schilddrüsenzelllinien 8505C, B-CPAP und FTC-133

In allen drei untersuchten Zelllinien wurde eine AUF1-Expression nachgewiesen. Weiterhin konnten in jeder Zelllinien die vier Isoformen detektiert werden. Dabei zeigten sich jedoch große Unterschiede in den exprimierten Mengen der einzelnen Isoformen. Die Abbildungen 9 und 10 zeigen die Expression der unbehandelten Zelllinien im Westernblot und stellen die Isoformenverteilung zueinander dar.

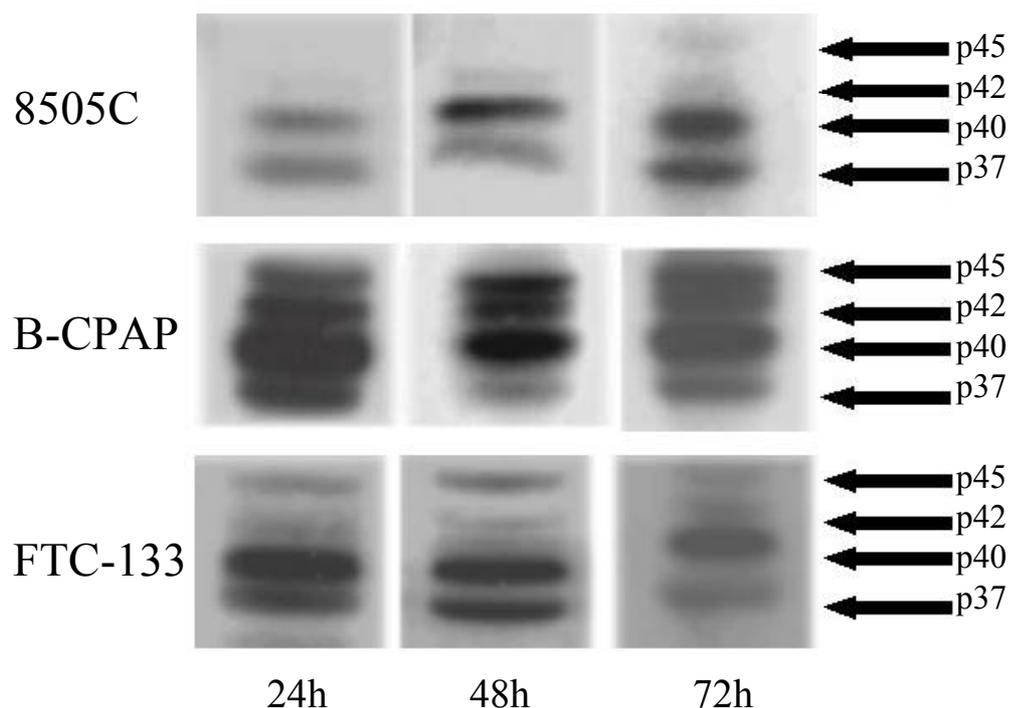


Abbildung 9: Westernblot der Proteine der unbehandelten Zelllinien zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Mit p37, p40, p42, p45 sind die AUF1-Isoformen gekennzeichnet.

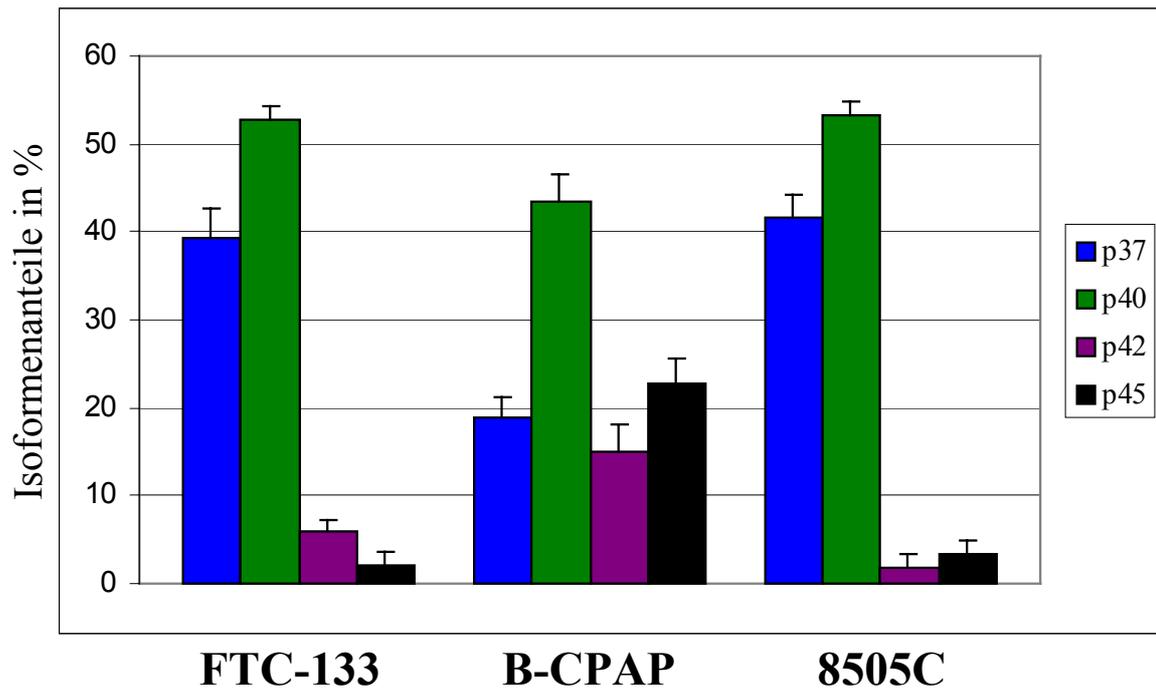


Abbildung 10: AUF1-Isoformenanteile in den untersuchten unbehandelten Zelllinien

In der Zelllinie 8505C sind die Isoformen p37 und p40 am stärksten exprimiert während die p42- und p45-Formen sehr gering ausgeprägt sind, es werden hier hauptsächlich Proteine ohne das Exon 7 translatiert. Ein ähnliches Bild zeigt sich in der Zelllinie FTC-133, auch hier sind die beiden kleineren Formen die prominentesten und p42 und p45 haben einen Anteil von unter 10%. Die Zelllinie B-CPAP zeigt eine andere Verteilung der Expression. Hier nehmen die Isoformen, die das Exon 2 enthalten, den größten Anteil an der Gesamtexpression.

Für die dargestellten Westernblots wurde immer die gleiche Menge an Protein aufgetragen und die gleiche Antikörpermenge eingesetzt. Der einzige Unterschied war die Expositionszeit während der Filmentwicklung. Diese war bei der Zelllinie 8505C mit drei Minuten am längsten (bei FTC-133 und B-CPAP eine Minute). Somit lässt es den Schluss zu, dass die Gesamt-AUF1-Expression in den Zelllinien B-CPAP und FTC-133 deutlich höher ist, als in der Zelllinie 8505C. Da es aber nicht möglich war, die Zelllinien durch eine mitgeführte Positivkontrolle miteinander zu vergleichen, ließ sich diese Schlussfolgerung nicht statistisch festigen.

3.1.2 Einfluss der Stimulation auf die Expression von AUF1 in Schilddrüsenzelllinien

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Stimulationsexperimente dargestellt. In diesen Versuchen wurde überprüft, wie sich die Expression von AUF1 in den untersuchten Zelllinien durch Stimulantien beeinflussen lässt. Hier wurden sowohl die Gesamtproteinmenge von AUF1 als auch die Anteile der einzelnen Isoformen untersucht. Es wurden die fünf in der Einleitung beschriebenen Stimulantien verwendet.

In Abbildung 11 sind die Antikörper-gefärbten Westernblots dargestellt.

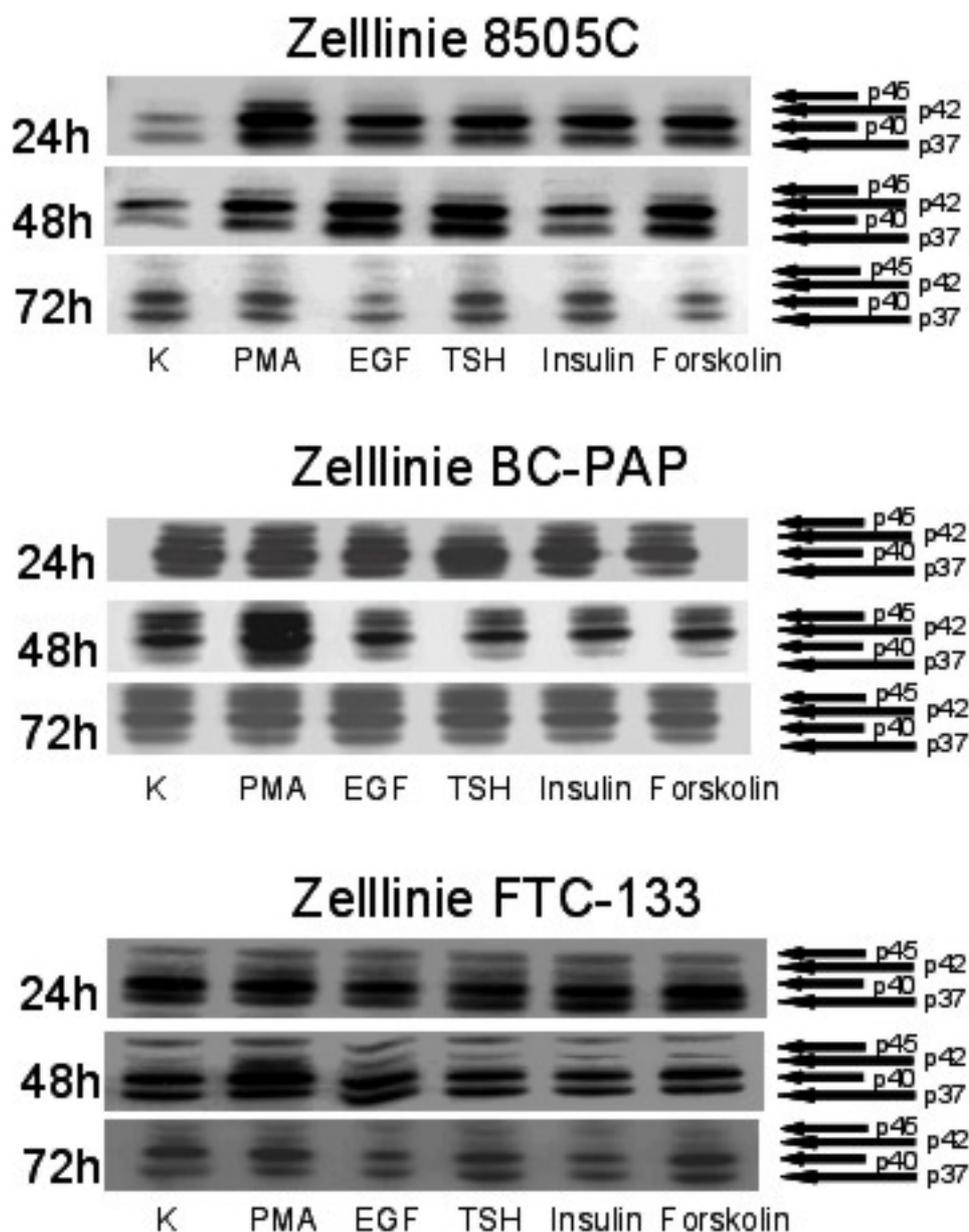


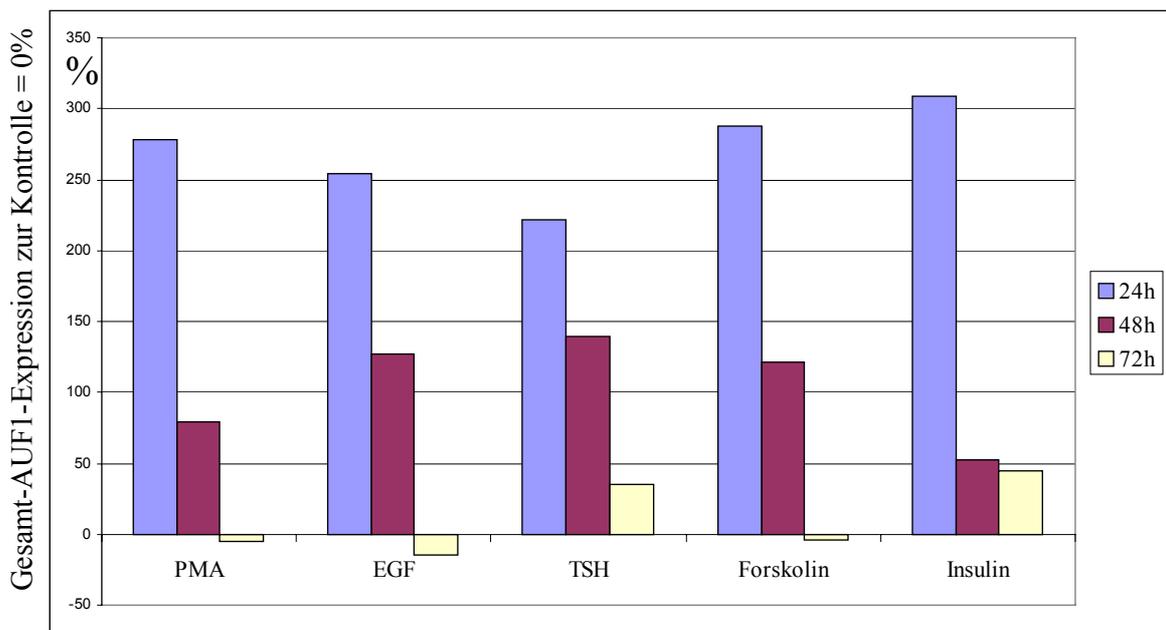
Abbildung 11: Detektierte Banden der AUF1-Isoformen der drei untersuchten Zelllinien; jeweils nach 24, 48 und 72h

Die ermittelten Werte werden in folgenden Diagrammen dargestellt und erörtert.

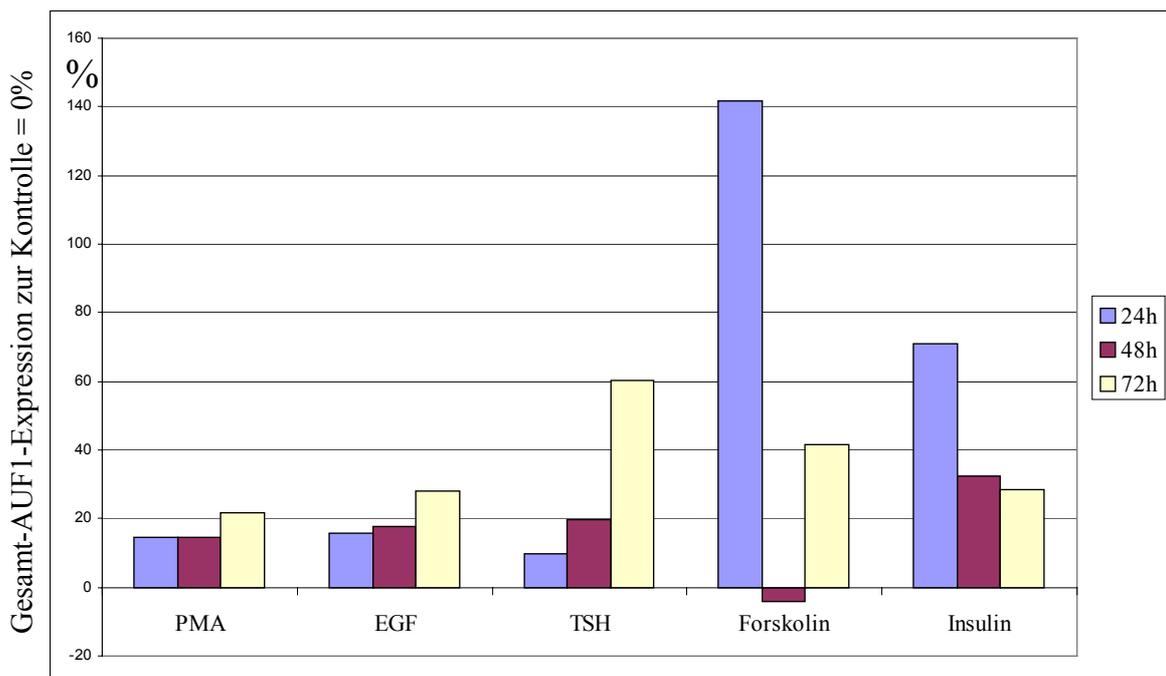
Gesamt-AUF1-Expression

Die Diagramme in Abbildung 12 zeigen die Gesamt-AUF1-Expression der Zelllinien

Zelllinie 8505C



Zelllinie B-CPAP



Zelllinie FTC-133

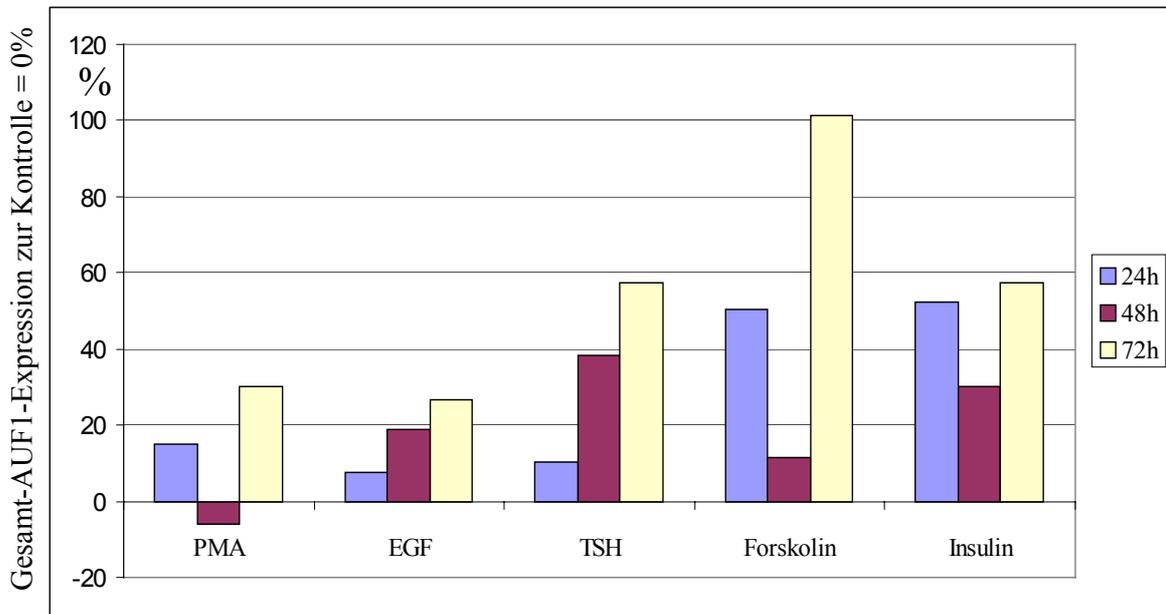


Abbildung 12: Verringerte und erhöhte Expression von AUF1 in den untersuchten Zelllinien nach 24, 48 und 72h, ausgewertet gegen die Kontrolle = 0%

Für die Zelllinie 8505C zeigte die Wirkung der verschiedenen Stimulantien ein ähnliches Bild. Am stärksten war eine Überexpression bei allen Stimulantien nach 24h mit einem Zuwachs zwischen 220 und 310%. Nach 48 und 72h ließen die Wirkungen nach, so dass nach 48h ein Zuwachs zwischen 50 und 150% zu verzeichnen war. Nach 72h zeigte sich eine zwischen 15% verringerte und 45% erhöhte Expression. Die Zelllinie 8505C zeigte somit die größte Steigerung der Expression von AUF1 in den untersuchten Zelllinien. Zu bemerken ist hier auch die ähnliche Wirkung der verschiedenen Stimulantien mit ihren unterschiedlichen Signalwegen. Es zeigte sich keine bevorzugte Signaltransduktion, die für eine direkte Wirkung auf die Gesamt-AUF1-Expression sprechen würde.

Die Zelllinie B-CPAP zeigt eine Steigerung der Expression um 10 bis 70%. Nur durch Forskolin wird dieser Wert nach 24h mit 140% überschritten und nach 48h mit -4% unterschritten. Der stärkste Einfluss war bei TSH, Forskolin und Insulin feststellbar, wobei die Maximalwirkung von Forskolin und Insulin nach 24h und die von TSH erst nach 72h eintrat. Im Vergleich zur Zelllinie 8505C konnten hier nur geringere Steigerungen erreicht werden und bei EGF, PMA und TSH trat die stärkste Wirkung erst nach 72h auf. Für Insulin wurden höhere Werte bestimmt als für EGF und PMA,

was auf eine Wirkung über die Proteinkinase B neben der Wirkung der Proteinkinase C schließen lässt.

Die dritte untersuchte Zelllinie FTC-133 zeigte ein ähnliches Bild wie die Zelllinie B-CPAP. Die Steigerung der Proteinexpression betrug zwischen 7 und 57%, nur bei PMA nach 48h wurde diese Spanne mit –6% unterschritten und bei Forskolin mit 102% überschritten. Auch hier hatten TSH, Forskolin und Insulin den quantitativ größten Einfluss. Die größte Wirkung wurde bei allen Stimulantien nach 72h erreicht, wie bei der Zelllinie B-CPAP blieb sie jedoch weit hinter dem Anstieg der Zelllinie 8505C.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit allen Stimulantien eine Überexpression erreicht werden konnte, diese aber innerhalb und zwischen den Zelllinien stark variierte. Die Zelllinien zeigten ein individuelles Ansprechen auf die verschiedenen Verbindungen und es kann kein favorisierter Signalweg erkannt werden. Eher scheint die Überexpression unabhängig von der verwendeten Stimulans zu sein, am eindrucksvollsten bei der Zelllinie 8505C zu sehen. Somit scheint die Zelle den AUF1-Pool der aktuellen Synthesituation anzupassen und der Expressionszuwachs ist umso ausgeprägter je niedriger die vorherige AUF1-Gesamtmenge war.

Einfluss auf die Isoformenzusammensetzung

Im Folgenden wird der Einfluss der Stimulation auf die Isoformen dargestellt. Hierbei wird zu erst die Zusammensetzung des gesamten AUF1-Protein-Pools betrachtet, um mögliche Veränderungen der relativen Isoformenanteile erkennen zu können. Die Abbildungen 13, 14 und 15 zeigen jeweils die Diagramme der Zelllinien nach der Behandlung mit Stimulantien nach 24, 48 und 72h.

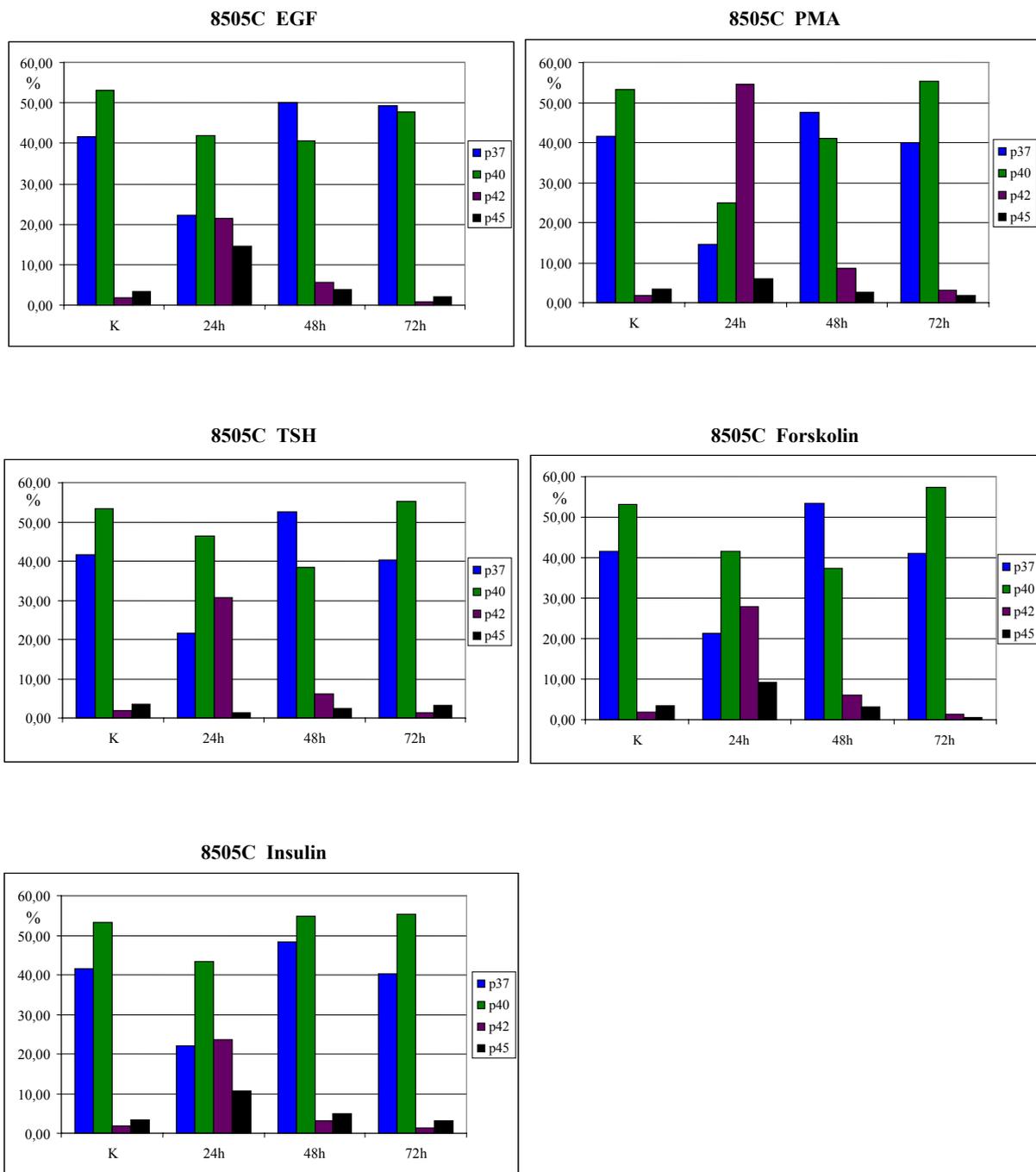


Abbildung 13: AUF1-Isoformenanteile der Zelllinie 8505C nach Stimulation über 24, 48 und 72h; K = Kontrolle

Die Verteilung der Isoformen von AUF1 in der Zelllinie 8505C ähnelt sich im Verlauf über 72h bei allen verwendeten Stimulantien. Außer nach der TSH-Einwirkung nimmt nach 24h der Anteil der Isoformen p42 und p45 erheblich zu. Nach 72h wird fast wieder die Ausgangssituation erreicht. Weiterhin gleichen sich die Verläufe der

dominanten Isoformen p37 und p40 nach Behandlung mit den verschiedenen Stimulantien. Die größte Veränderung zeigt immer die Isoform p42, die in der unbehandelten Zellkultur den kleinsten Anteil besitzt und somit in dieser den geringsten Einfluss auf die mRNA Ausstattung der Zelle hat.

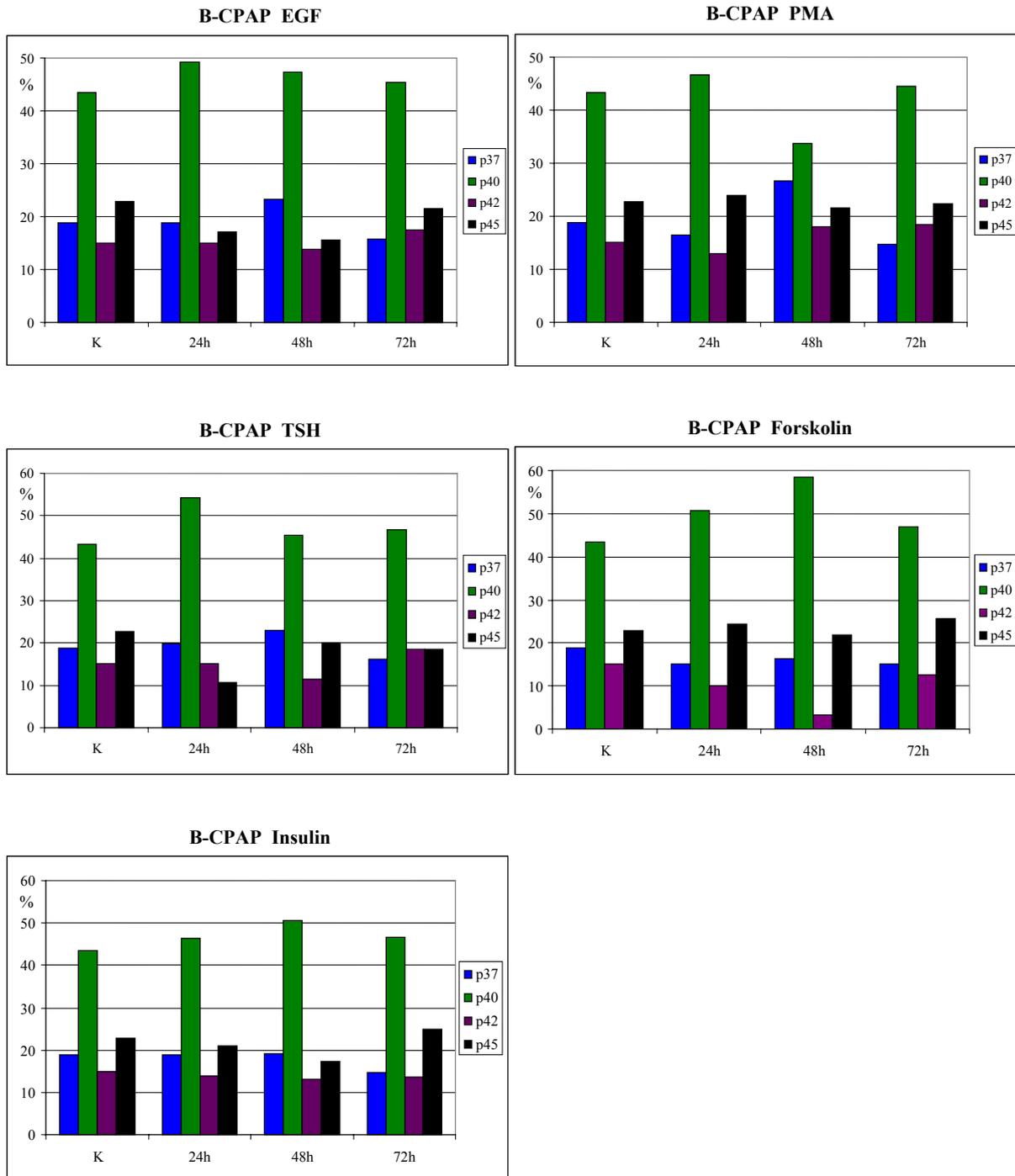
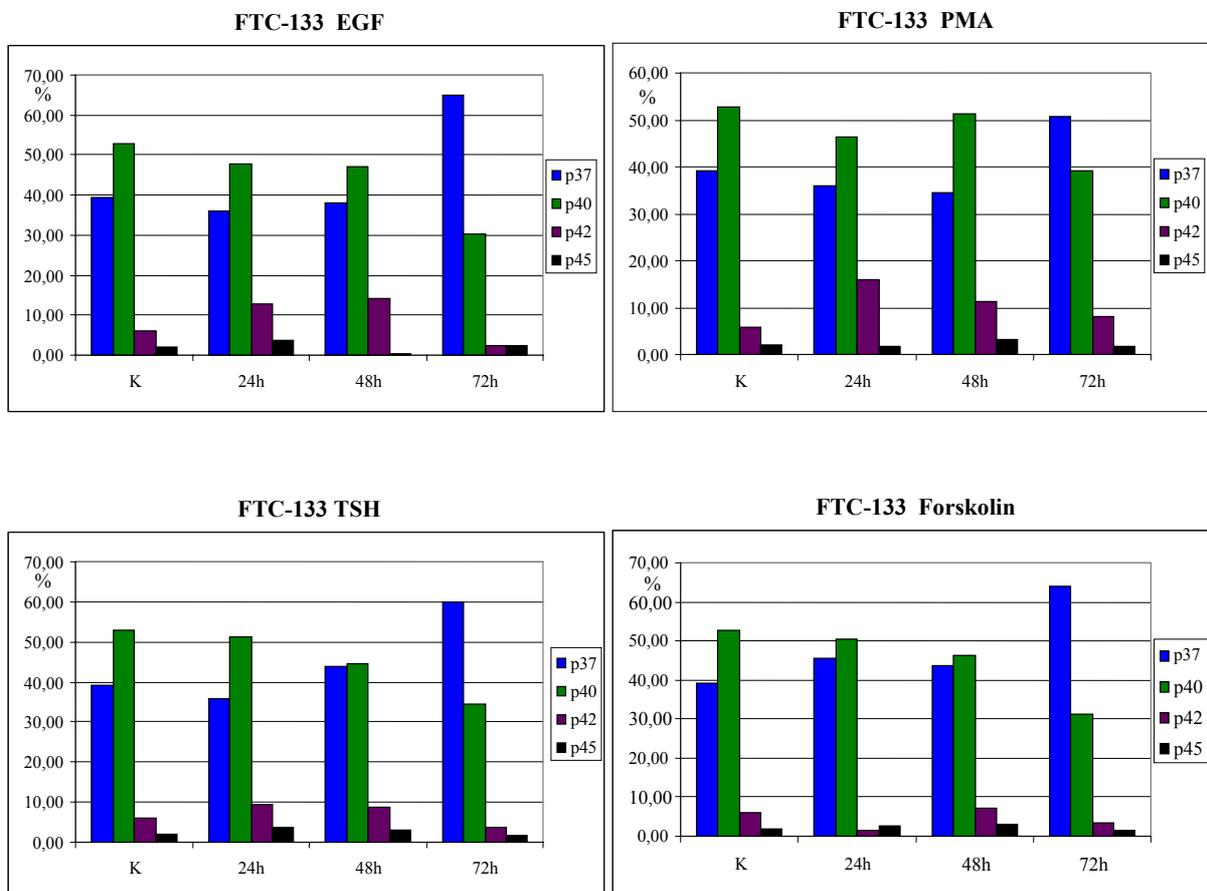


Abbildung 14: AUF1-Isoformenanteile der Zelllinie B-CPAP nach Stimulation über 24, 48 und 72h; K = Kontrolle

Auch bei der Zelllinie B-CPAP gleichen sich die Verläufe über 72h. Nach 24h kommt es zu einer Erhöhung der Isoform p40, die vor und während des Versuchs immer die am stärksten vertretene Isoform ist. Nach 72h gleichen sich die initial erreichten Änderungen fast wieder aus, so dass annähernd die Ausgangsverteilung wieder erreicht wird. Insgesamt sind die Änderungen der jeweiligen Anteile im Vergleich zur Zelllinie 8505C geringer und keine der verwendeten Stimulantien zeigt eine Wirkung auf eine selektive Isoform. Demnach ist wie Eingangs erwähnt die Veränderung der Zusammensetzung der AUF1-Proteine bei allen Stimulantien sehr ähnlich.



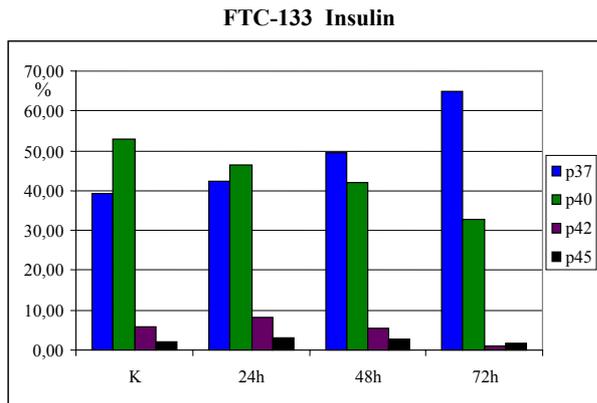


Abbildung 15: AUF1-Isoformenanteile der Zelllinie FTC-133 nach Stimulation über 24, 48 und 72h; K = Kontrolle

Die Zelllinie FTC-133 zeigt nahezu identische Verläufe der Zusammensetzungen der Isoformen über einen Zeitraum von 72h. Im Vergleich zu den anderen Zelllinien wird hier aber nicht die Ausgangszusammensetzung erreicht. Eher kommt es zu einer stetigen Verschiebung der Anteile, die nach 72h noch nicht beendet zu sein scheint. Besonders auffällig ist die Isoform p37, deren Anteil zunimmt und bei 72h immer die dominanteste ist. Eine gegenläufige Entwicklung erfährt die Isoform p40, deren Anteil konstant abnimmt und so auch nicht mehr vorherrschend ist. Dennoch ist sie jeweils um ein Vielfaches erhöht im Vergleich zu den Isoformen p42 und p45. Beide haben nach Beginn der Stimulation zunächst nach 24h einen Zuwachs am Proteinanteil (außer bei Forskolin, hier nach 48h), nach 72h zeigt sich jedoch ein Abfall bis unter die Ausgangswerte (außer bei PMA).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Reaktion der Zelllinien auf verschiedene Reize, hier speziell verschiedene Stimulantien, in der Zusammensetzung der Isoformen der AUF1-Proteine innerhalb der einzelnen Zelllinien immer einen ähnlichen Verlauf hat. Unabhängig welcher Rezeptor oder welcher second Messenger beeinflusst wird, ist die Wirkung vergleichbar. Vergleicht man die aktivierten Proteinkinasen zwischen den Zelllinien, so lässt sich nur ein leichter Unterschied feststellen. So liegt der Anteil der Isoformen p42 und in geringerem Maße der Isoform p45 nach Stimulation mit EGF und PMA höher als nach Stimulation mit TSH und Forskolin. Dies würde für eine selektive Beeinflussung der größeren Isoformen (Exon 7 beinhaltend) durch die Proteinkinase C sprechen. Insulin, das auch die Proteinkinase C beeinflusst, zeigt einen ähnlichen aber weniger

drastischen Verlauf für die Isoformen p42 und p45 in den Zelllinien. Somit scheint die katabole Wirkung von EGF und PMA im Vergleich zur anabolen Wirkung des Insulins zum Tragen zu kommen. Unter diesem Gesichtspunkt sei noch einmal auf die ähnlichen Verläufe der AUF1-Protein-Zusammensetzung hingewiesen, die trotz unterschiedlicher Signalwege, unterschiedlich aktivierter Enzyme und unterschiedlicher physiologischer Wirkung auftritt.

Einfluss auf die einzelnen AUF1-Isoformen

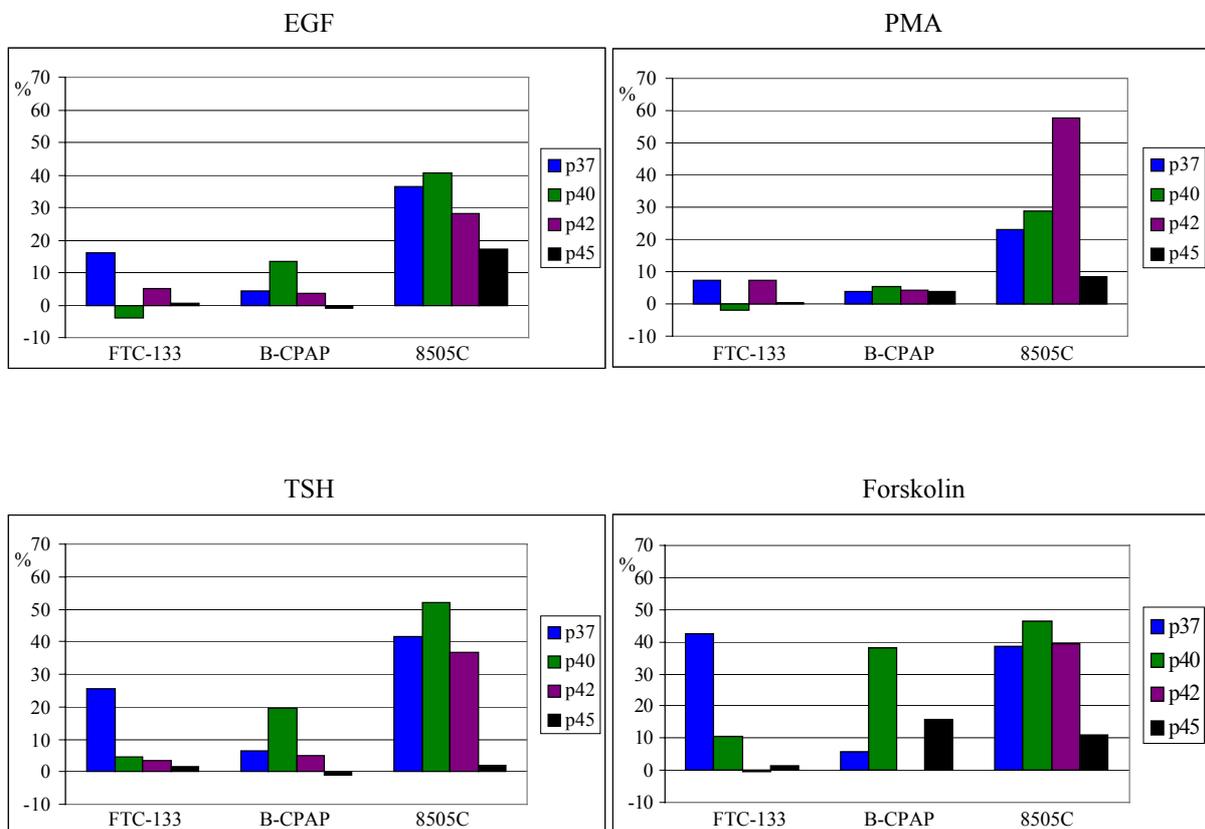
Im Folgenden soll der qualitative und quantitative Einfluss der verwendeten Stimulantien auf die einzelnen Isoformen untersucht werden. In Tabelle 8 ist die qualitative Wirkung auf die Expression dargestellt, unabhängig davon wie stark sich die Expression geändert hat. In dieser Tabelle sind alle drei Zelllinien zusammengefasst, also drei biologische Systeme mit unterschiedlichen Ausgangszuständen, um eine mögliche universelle Reaktion der Isoformen erfassen zu können.

	p37	p40	p42	p45
EGF	8 : 1	6 : 3	7 : 2	5 : 4
PMA	6 : 3	5 : 4	8 : 1	8 : 1
TSH	9 : 0	9 : 0	7 : 2	8 : 1
Forskolin	7 : 2	8 : 1	6 : 3	7 : 2
Insulin	9 : 0	8 : 1	8 : 1	8 : 1

Tabelle 8: Wirkung der Stimulantien auf die Expression der Isoformen (Ereignisse mit erhöhter Expression : Ereignisse mit verminderter Expression)

Die Stimulantien bewirken überwiegend eine Überexpression der Isoformen. EGF und PMA zeigen dabei die größten Schwankungen zwischen erhöhter und verminderter Expression. EGF wies eine konstantere Wirkung auf p37 und p40 auf, während PMA diesen Einfluss bei den beiden größeren Isoformen (p42 und p45) zeigt. Bei TSH und Forskolin wurde bei der Isoform p42 die geringste Kontinuität festgestellt. Insulin hat den konstantesten Einfluss und bewirkt zu annähernd 100% eine Überexpression bei allen Isoformen.

Für die quantitative Darstellung wurden die Zelllinien wieder einzeln betrachtet und in gleich skalierten Diagrammen (Abb. 16) aufgetragen, um einen besseren Vergleich zu ermöglichen.



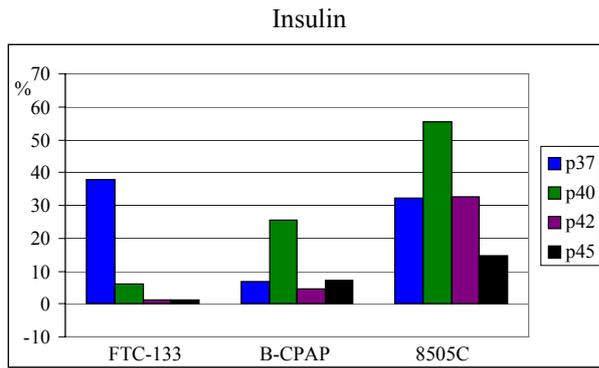


Abbildung 16: Verringerte und erhöhte Expression der AUF1-Isoformen nach Stimulation in %; Die Angaben beziehen sich auf den Zuwachs der Ausgangsgesamtexpression.

Keine der Stimulantien bewirkt in allen drei Zelllinien den gleichen Effekt. Eher zeigt sich, dass die unterschiedlichen Reize eine ähnliche Wirkung in jeder einzelnen Zelllinien hervorrufen. Bei den Zelllinien FTC-133 und B-CPAP steigt der Anteil der anfänglich prominentesten Isoform am stärksten an. Etwas anders verhält es sich bei der Zelllinie 8505C, hier steigt die Expression der Isoformen p37, p40 und p42 am stärksten.

Der Unterschied zwischen den einzelnen Stimulantien liegt in der Höhe des quantitativen Zuwachses. Hier zeigt sich, dass der Einfluss von TSH, Forskolin und Insulin meist stärker ist als der von EGF und PMA. Dies wurde Eingangs bereits in der Betrachtung der Gesamt-AUF1-Expression dargestellt und hat sich auch für die einzelnen Isoformen bestätigt. Das auch Insulin stärker wirkt als EGF und PMA und im Ausmaß der Expression eher TSH und Forskolin ähnelt, spricht für einen anderen Wirkmechanismus als den über die Proteinkinase C.

3.2 Ergebnisse der Patientengewebe

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Westernblot-Analyse und der immunhistochemischen Untersuchungen für die Patientengewebe vorgestellt.

3.2.1 AUF1-Expression in Patientengewebe in der Westernblotuntersuchung

Abbildung 17 zeigt die detektierten Banden der untersuchten Patientengewebe.

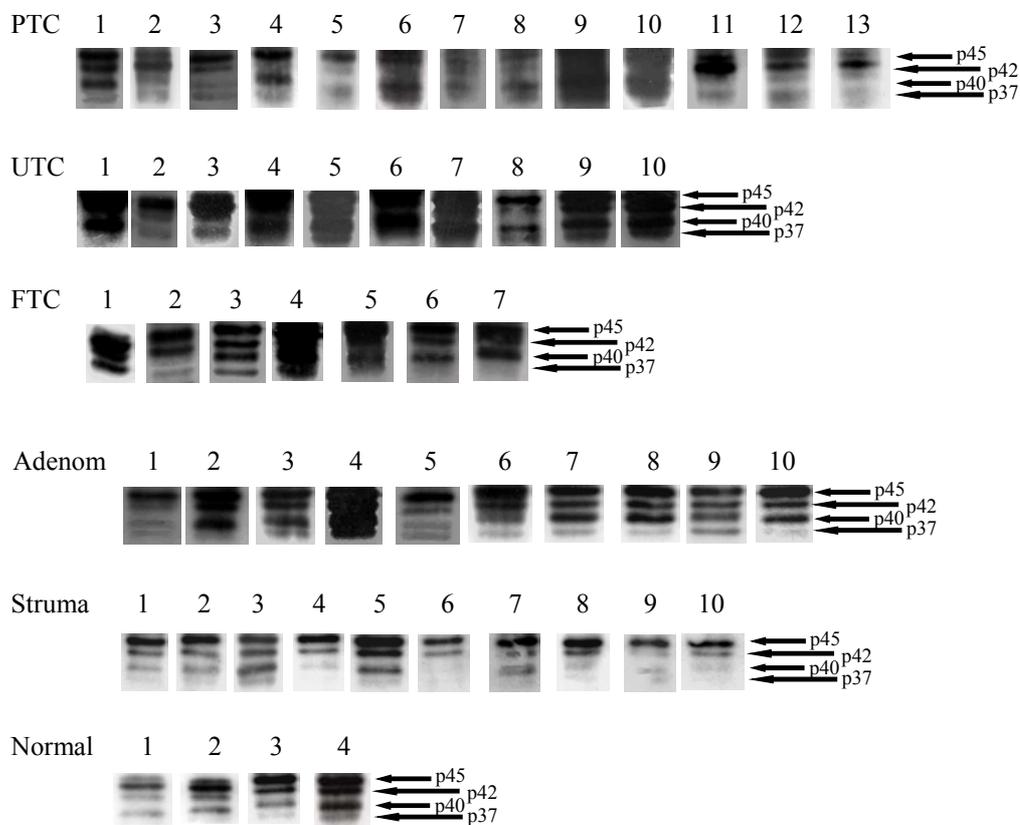
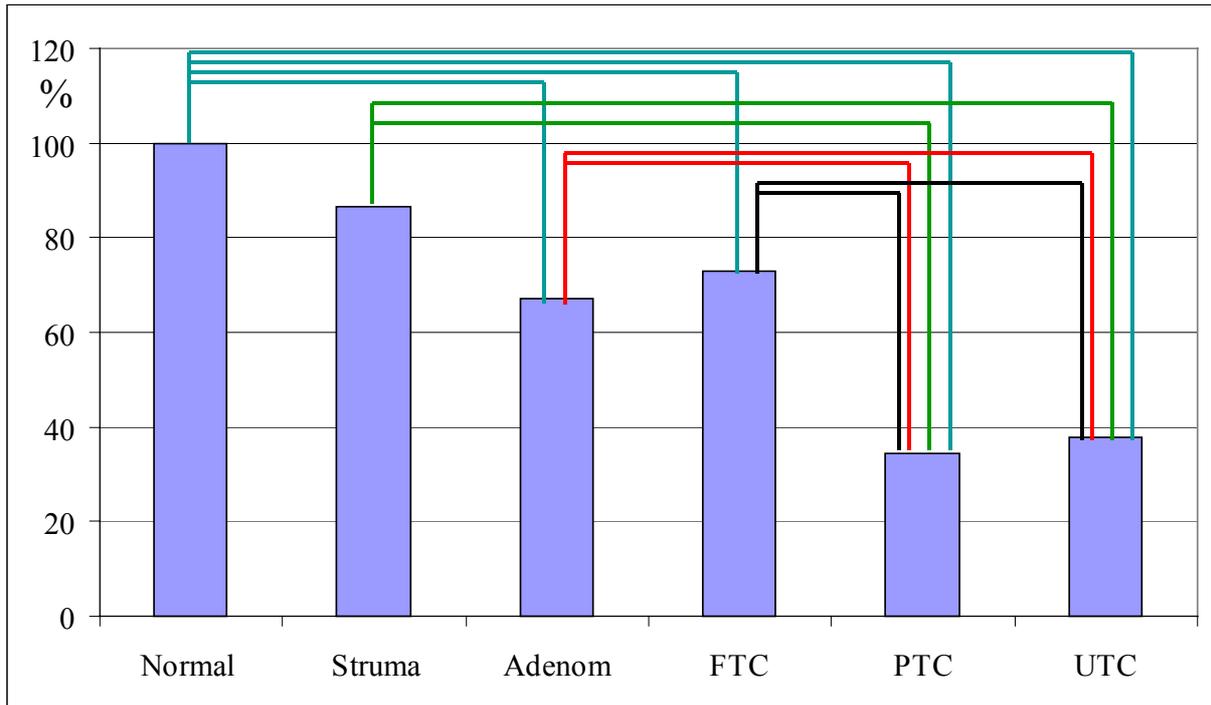


Abbildung 17: Detektierte Banden nach Antikörperfärbung; geordnet nach Entitäten; jeweils rechts sind exemplarisch die Isoformen gekennzeichnet

Gesamt-AUF1-Expression

Bei den folgenden Darstellungen wurden die untersuchten Entitäten miteinander verglichen. Die Werte der Vertreter jeder Gruppe wurden für die graphische Visualisierung zu einem Mittelwert zusammengefasst. Es wurden der t-Test und der Mann-Whitney-Test für die Berechnung der Signifikanz verwendet.

Als erstes soll die Gesamt-AUF1-Expression der verschiedenen Gewebe betrachtet werden. Abbildung 18 zeigt diese in Bezug auf 100% der Expression von Normalgewebe mit den entsprechenden Signifikanzen (Tabelle darunter).



Normal zu Struma	n.s.
Normal zu Adenom	p = 0,011
Normal zu FTC	p = 0,047
Normal zu PTC	p = 0,0092
Normal zu UTC	p = 0,0022
FTC zu PTC	p = 0,039
FTC zu UTC	p = 0,039
PTC zu UTC	n.s.

Struma zu Adenom	n.s.
Struma zu FTC	n.s.
Struma zu PTC	p = 0,0026
Struma zu UTC	p = 0,0024
Adenom zu FTC	n.s.
Adenom zu PTC	p = 0,001
Adenom zu UTC	p = 0,002

Abbildung 18: Vergleich der Gesamt-AUF1-Expression der untersuchten Entitäten

oben: Darstellungen im Diagramm; die Verbindungen zwischen Säulen stehen für einen signifikanten Unterschied

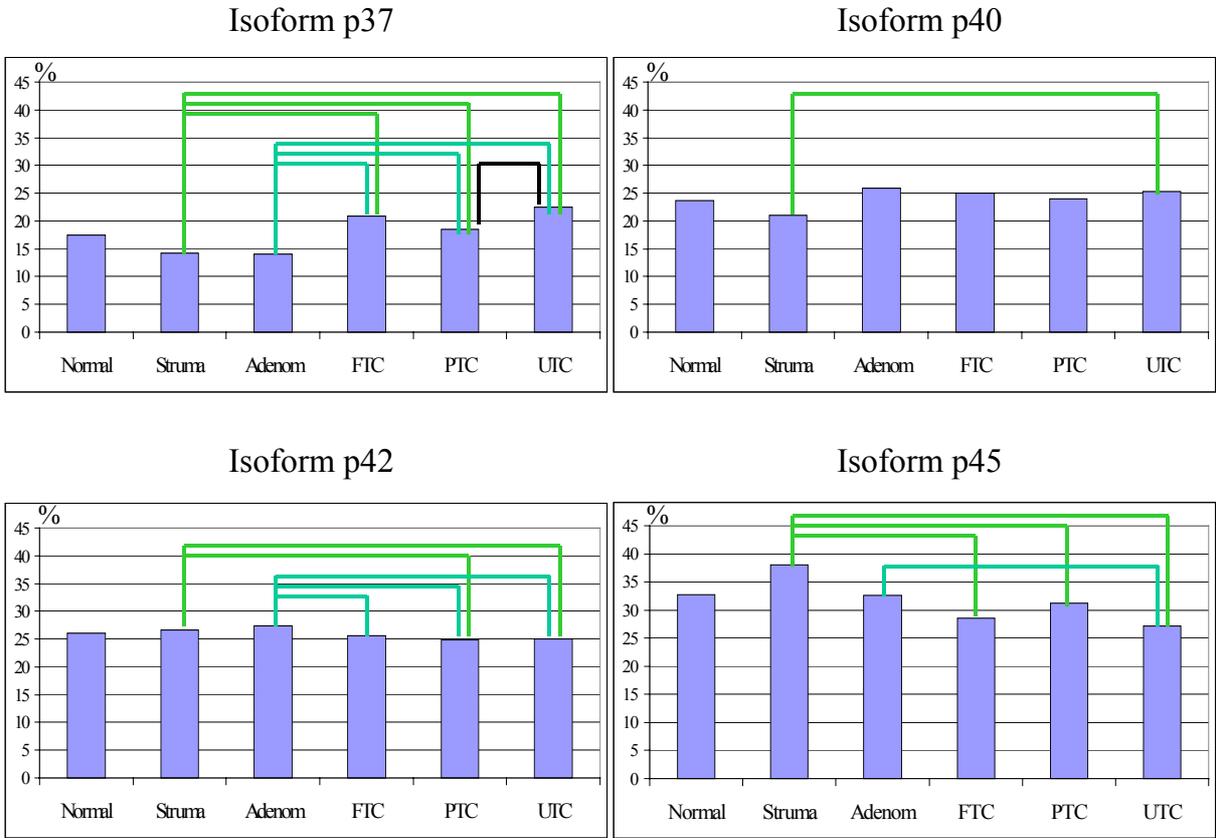
unten: Tabelle mit den einzelnen Signifikanzen; n.s. = nicht signifikant

Die höchste Expression von AUF1-Proteinen ließ sich in Normalgewebe feststellen. Alle entarteten Gewebe zeigten ein niedrigeres Expressionslevel, wobei sich ein

Gefälle von Normal über die benignen zu den malignen Geweben zeigt. Die Gewebe von PTC und UTC wiesen nur noch weniger als 40% der Expression der Normalgewebe auf.

Unterschiede in den einzelnen Isoformen

Als nächstes sollen die vier Isoformen betrachtet werden. Hierzu werden deren Anteile an der Gesamt-Expression von AUF1 in den Geweben direkt miteinander verglichen. Jedes Diagramm in Abbildung 19 zeigt den Anteil der Expression einer Isoform in den einzelnen Gewebearten.



Isoform p37	
Struma zu FTC	p = 0,0007
Struma zu PTC	p = 0,0023
Struma zu UTC	p = 0,0001
Adenom zu FTC	p = 0,0008
Adenom zu PTC	p = 0,0026
Adenom zu UTC	p = 0,0001
PTC zu FTC	p = 0,0201

Isoform p42	
Struma zu PTC	p = 0,0023
Struma zu UTC	p = 0,0001
Adenom zu FTC	p = 0,0008
Adenom zu PTC	p = 0,0026
Adenom zu UTC	p = 0,0001

Isoform p40	
Struma zu UTC	p = 0,003

Isoform p45	
Struma zu FTC	p = 0,0001
Struma zu PTC	p = 0,0207
Struma zu UTC	p = 0,0001
Adenom zu UTC	p = 0,0443

Abbildung 19: Isoformenanteile an der Gesamt-AUF1-Expression der einzelnen Gewebearten

oben: Darstellung im Diagramm; die Verbindungen zwischen Säulen stehen für einen signifikanten Unterschied

unten: Tabelle mit den einzelnen Signifikanzen nach dem t-Test, auf Normalverteilung wurde ausreichend getestet

In allen Entitäten außer UTC gibt es die selbe Reihenfolge im quantitativen Anteil der Isoformen. Die Isoform p37 nimmt immer den geringsten Anteil ein, gefolgt von p40, p42 und p45. Nur bei den UTC-Geweben hat p40 einen größeren Anteil als die Isoform p42. Da das Verhältnis der Isoformen zueinander und ihr jeweiliger Anteil an der Gesamtexpression wichtig für die physiologischen Vorgänge in einer Zelle zu

sein scheinen, soll Abbildung 20 diesen Zusammenhang für die unterschiedlichen Zustände von Schilddrüsengeweben verdeutlichen.

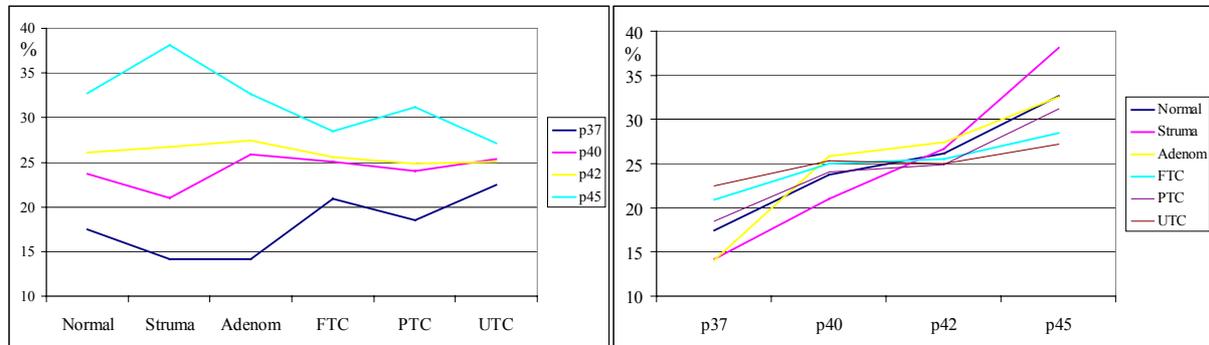


Abbildung 20: Anteile der AUF1-Isoformen aller untersuchten Entitäten in zwei verschiedenen Darstellungen

Es zeigt sich, dass die Verteilung mit steigender Malignität ausgeglichener wird und somit der Einfluss der Isoformen p37 und p40 größer. Analog der Klassifizierung von Tumoren benigne-normal-maligne führt die Betrachtung der Expression der AUF1-Isoformen zu dem Ergebnis, dass Normalgewebe eine Mittelstellung einnehmen und eine Veränderung der Proteinausstattung zu einer Entartung in die eine oder andere Richtung führt.

3.2.2 AUF1-Expression und Verteilung in Patientengeweben in Gefrierschnitten

Abschließend sollen die Ergebnisse der histologischen Untersuchung von Gefrierschnitten dargestellt werden. Hierzu werden zwei Bilder pro Entität (Abb. 22 - 27) mit repräsentativem Färbemuster bei 40- und 100-facher Vergrößerung gezeigt. Die 40-fache Vergrößerung gibt einen Überblick über die Färbung eines Gewebeausschnittes und die 100-fache Vergrößerung ermöglicht die Differenzierung zwischen Kern- und Cytosolfärbung. Außerdem sollen Beispiele für Negativkontrollen gegeben werden. Hierfür wurden in Abbildung 21 ein Schnitt des Normalgewebes und ein Schnitt eines UTC-Gewebes ausgesucht, da diese die stärkste und schwächste Färbung aufwiesen.

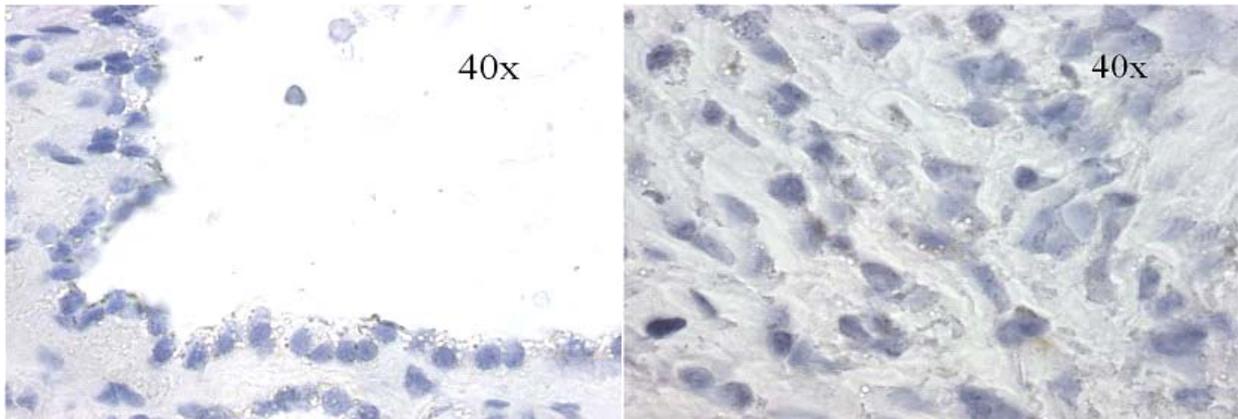


Abbildung 21: Beispiel für Negativkontrollen eines Normalgewebe- und eines UTC-Gewebegefrierschnittes

In der Negativkontrolle ist nur die Blaufärbung durch die Hämalaunfärbung zu erkennen, somit sind alle nachfolgend gezeigten Braunfärbungen als Nachweis des AUF1-Proteins zu sehen.

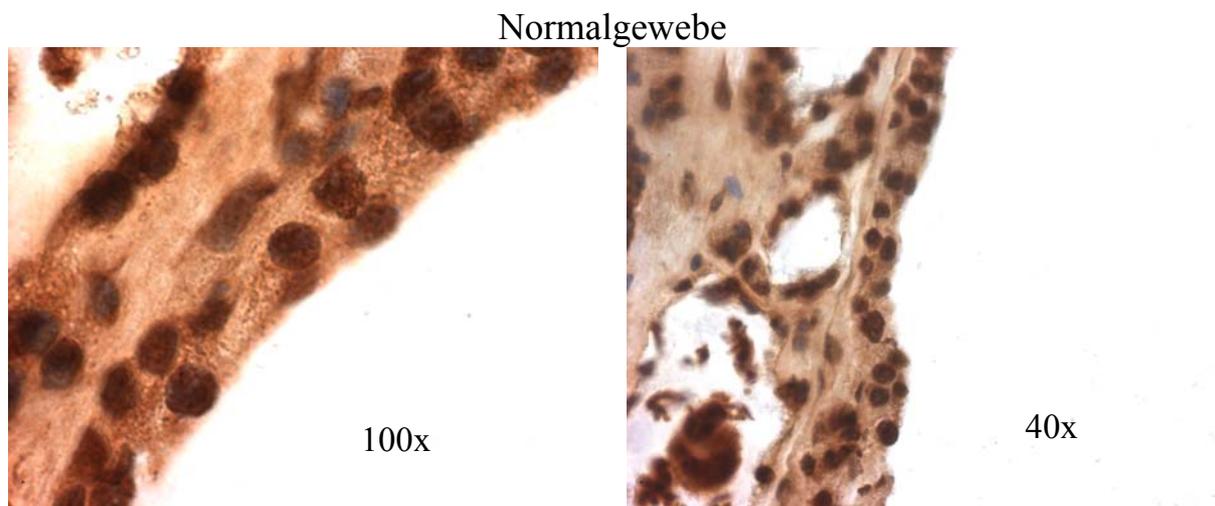


Abbildung 22: Normalgewebe in 40- und 100-facher Vergrößerung

In dem untersuchten Normalgewebe zeigt sich eine sehr starke Färbung von Kern und Cytosol, wobei die Kerne noch intensiver und homogener gefärbt sind.

Strumagewebe

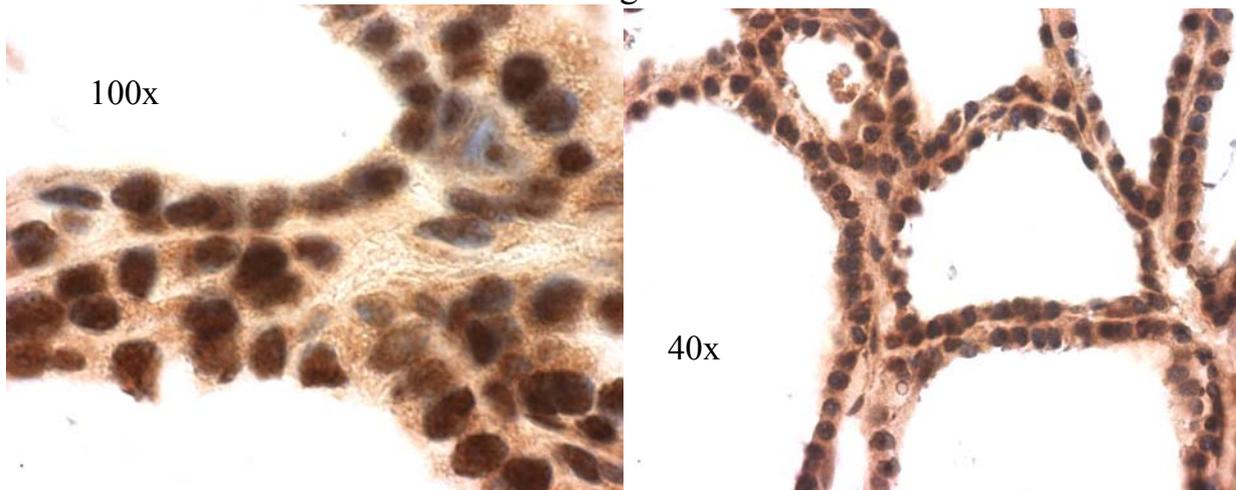


Abbildung 23: Strumagewebe in 40- und 100-facher Vergrößerung

Die Strumagewebe zeigen ein ähnliches Färbemuster wie das Normalgewebe. Kern und Cytosol sind sehr stark gefärbt, auch hier ist die Kernfärbung überlegen, aber das Cytosol ist etwas weniger gleichmäßig gefärbt.

Adenomgewebe

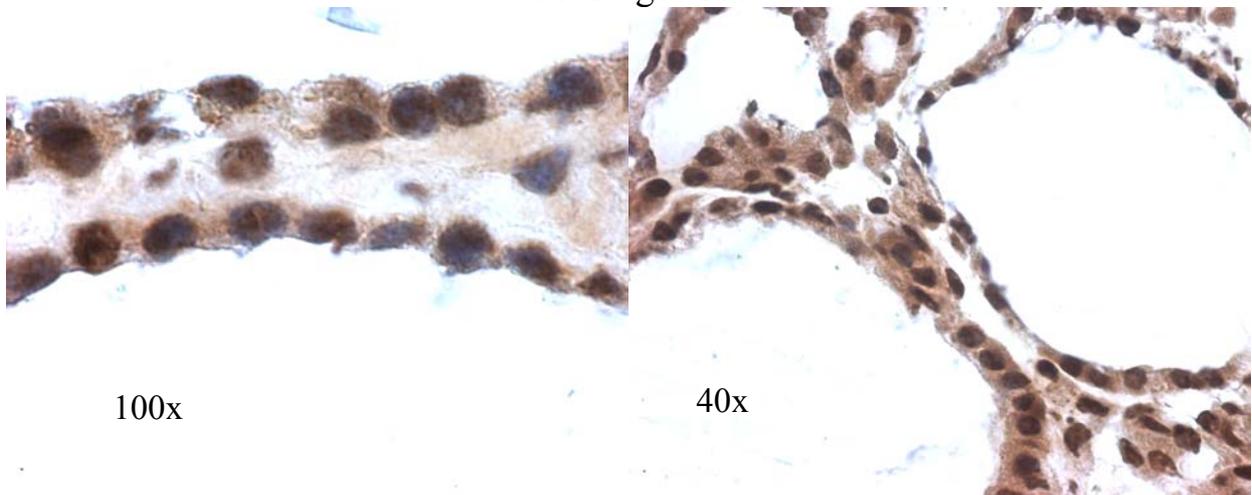


Abbildung 24: Adenomgewebe in 40- und 100-facher Vergrößerung

Die Adenomgewebe zeigen eine weniger starke Färbung als die Normal- und Strumagewebe. Wiederum ist die Kernfärbung intensiver als die Cytosolfärbung.

FTC - Gewebe

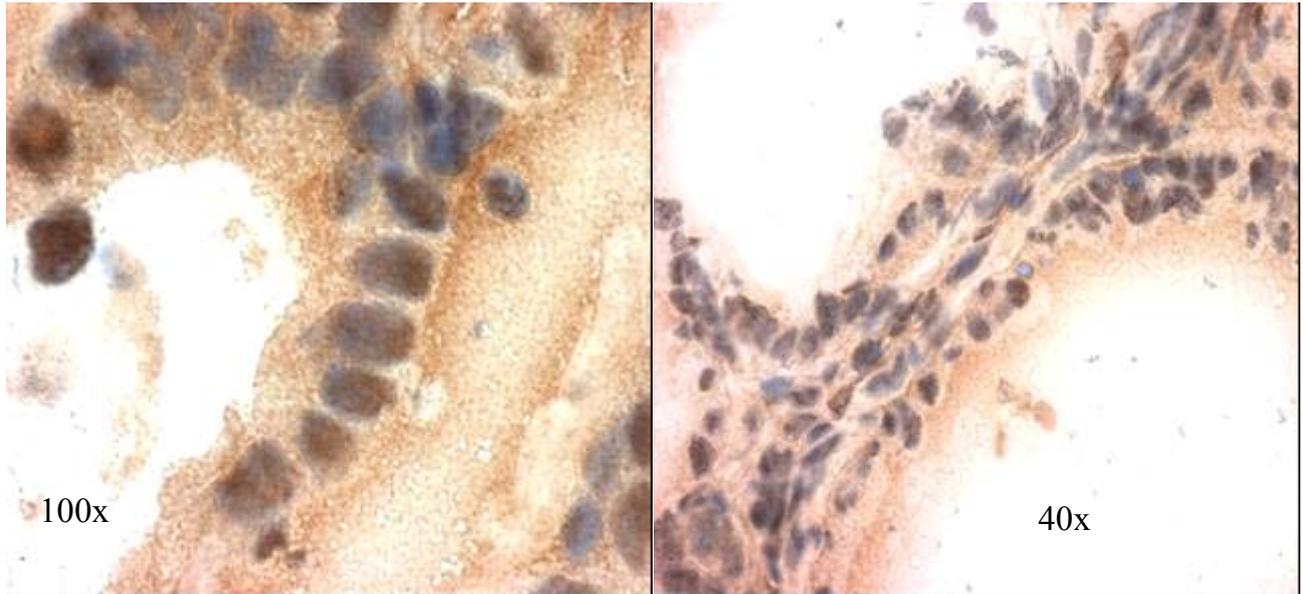


Abbildung 25: FTC-Gewebe in 40- und 100-facher Vergrößerung

Insgesamt ist die Färbung der FTC-Gewebe schwächer. Die Kern- und Cytosolfärbung ist in etwa gleich stark. Hier erkennt man auch die größte Veränderung im Vergleich zu den drei zuerst betrachteten Geweben, bei denen die AUF1-Färbung die Hämalaunfärbung der Kerne nahezu komplett überdeckte.

PTC - Gewebe

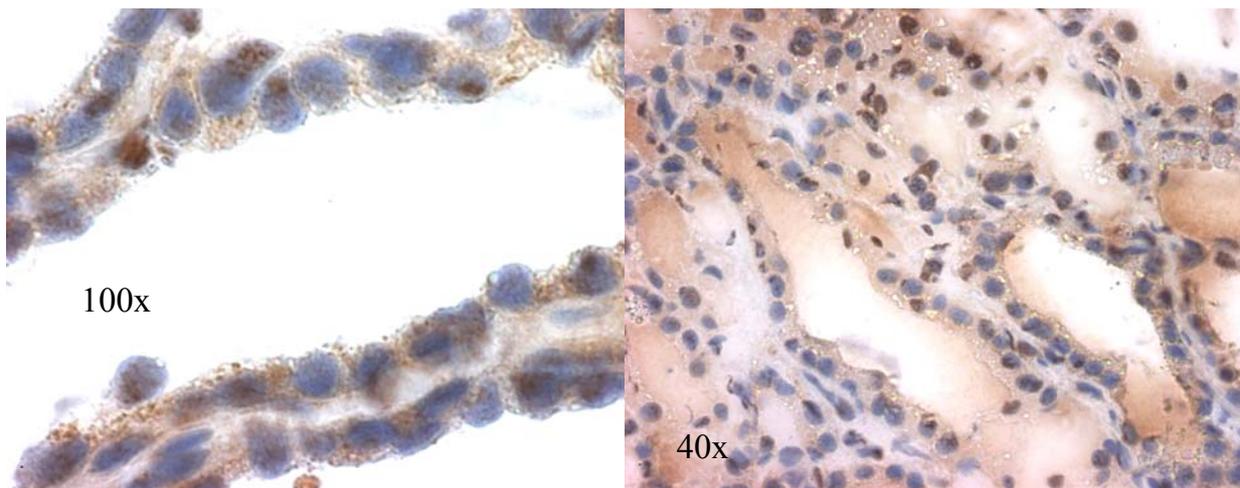


Abbildung 26: PTC-Gewebe in 40- und 100-facher Vergrößerung

Die PTC-Gewebe zeigen eine sehr schwache Färbung. Zudem ist fast keine Färbung

der Kerne zu erkennen und im Cytosol befinden sich die meisten AUF1-Proteine.

UTC - Gewebe

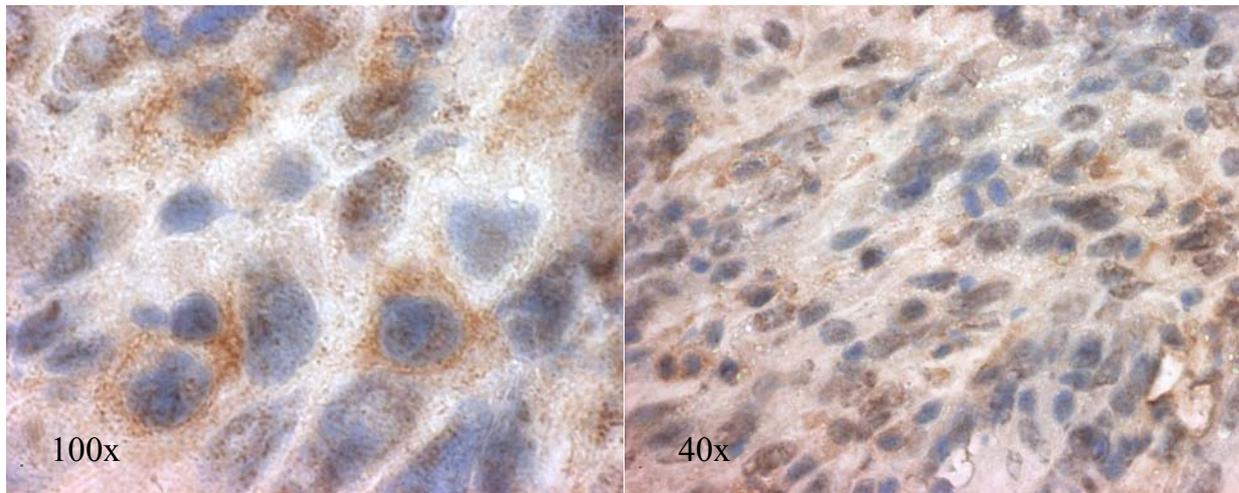


Abbildung 27: UTC-Gewebe in 40- und 100-facher Vergrößerung

Neben den PTC-Geweben zeigen die UTC-Gewebe die schwächste Färbung der untersuchten Entitäten. Auch hier zeigt sich die stärkste Färbung im Cytosol, wobei sich sehr oft eine erhöhte Aggregation um den Zellkern zeigt.

Die Tabelle 9 zeigt die Auswertung der Schnitte nach dem SI-Index.

Gewebeart	Ø Farbintensität	Ø der Zellen mit stärkster Intensität	Ergebnis des SI-Index	Kern-Cytosol Relation
Normalgewebe	3	4	++ stark	Kern >> Cytosol
Strumagewebe	3	4	++ stark	Kern >> Cytosol
Adenomgewebe	2	3	+ mäßig	Kern > Cytosol
FTC-Gewebe	2	3	+ mäßig	Kern = Cytosol
PTC-Gewebe	2	2	(+) schwach	Kern < Cytosol
UTC-Gewebe	1	2	(+) schwach	Kern < Cytosol

Tabelle 9: Ergebnisse der Immunhistochemie nach dem SI-Index

Da die Farbeintensität der Schnitte auch für die Menge des detektierten Proteins steht, zeigen die immunhistologischen Untersuchungen das selbe Ergebnis wie der Westernblot. Die Normalgewebe zeigen die größte Menge an AUF1-Proteinen gefolgt von den benignen Entartungen. Am schwächsten gefärbt und somit mit der

geringsten Menge an AUF1 ausgestattet sind die malignen Gewebe, im Besonderen PTC und UTC. Im Gegensatz zum Westernblot lassen sich hier keine Aussagen zu den einzelnen Isoformen treffen. Dafür lässt sich die Lokalisation untersuchen. Hierbei stellt sich klar dar, dass in den normalen und benignen Geweben mehr AUF1-Proteine im Kern zu finden sind und in den malignen Geweben die ohnehin wenigeren AUF1-Proteine hauptsächlich im Cytosol lokalisiert sind. Besonders gut ist dies wiederum bei den PTC- und UTC-Geweben zu beobachten.

4 Diskussion

AUF1 ist ein ubiquitäres Protein, dessen Funktion nach und nach entdeckt wird. Zahlreiche Arbeitsgruppen zeigten verschiedene Bereiche in der Biochemie der Zelle in denen eine Rolle nachgewiesen werden konnte (Abb. 28).

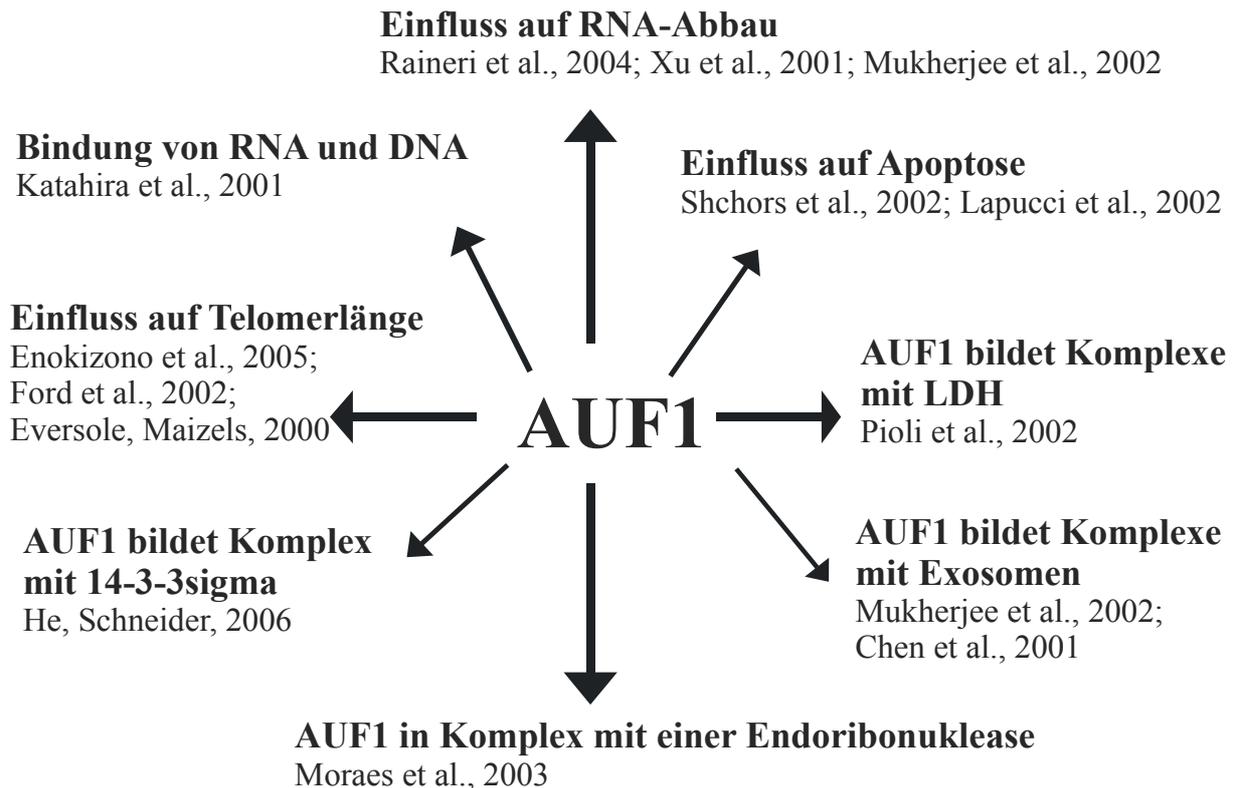


Abbildung 28: Übersicht der nachgewiesenen Wirkungen von AUF1

Für den Menschen und dessen einzelne Organe und somit mögliche medizinische Bedeutungen von AUF1 gibt es bisher sehr wenige Daten. Um eine Brücke zur hier untersuchten Schilddrüse zu schlagen, soll auf ein Ziel der AUF1-Isoformen das Proto-Onkogen *c-myc* [Chen et al., 1995] hingewiesen werden. Für *c-myc* wurde gezeigt, dass eine Überexpression eine kritische Rolle im Wachstum von Schilddrüsenkarzinomzelllinien spielt und wird so mit neoplastischen Entwicklungen in Verbindung gebracht [Cerutti et al., 1996]. Dies zeigt die potentielle Rolle von AUF1, da es durch fehlerhaftes Arbeiten diese Überexpression verursachen kann.

4.1 AUF1 in Schilddrüsenzelllinien

In allen drei Zelllinien konnte jede der vier Isoformen nachgewiesen werden. Somit ist ausgeschlossen, dass ein Fehler in der Prozessierung von AUF1 die Zelle in ihr unphysiologisches Verhalten zwingt.

Die verschiedenen Ausgangszustände zeigen Zelllinien, die aus entarteten Geweben gewonnen wurden, das heißt keiner ist als normal anzusehen. In allen drei Zelllinien ist der Anteil der Isoformen p37 und p40 hoch, bei FTC-133 und 8505C sind diese fast ausschließlich zu finden. Durch das Fehlen des Exons 7 werden p37 und p40 stark ubiquitiniert, wodurch ein schnellerer Umsatz dieser Isoformen, aber auch ein bis zu zehnfach schnellerer RNA-Abbau über Proteasomen möglich ist [Laroia et al., 2002; Moraes et al., 2003]. Auch durch andere Gruppen konnte für p37 und p40 das stärkste Potential für den Einfluss auf den RNA-Abbau gezeigt werden [Sarkar et al., 2003]. Das Fehlen der beiden großen Isoformen führt zu einer erhöhten RNA Synthese [Sarkar et al., 2003] und zu einer gestörten Regulation der Telomerlänge, da gerade die Isoformen p42 und p45 ein hohes Potential zum Regulieren dieser haben [Eversole, Maizels, 2000]. Der geringe Anteil der größeren Isoformen könnte so ein Indiz für unphysiologisches Wachstum sein. Untersuchungen an Mäusen zeigten in gesunden Geweben einen höheren Anteil der p42 und p45 Isoformen im Vergleich zu den kleineren Isoformen [Gouble et al., 2000]. Das Fehlen könnte auch die schnellere Proliferation und längeres Überleben erklären, da den Isoformen p42 und p45 eine Rolle in der geregelten RNA-Transkription, -Prozessierung und -Translation zugeschrieben wird [Sarkar et al., 2003], was in Karzinomzelllinien zu erwarten ist. In den Schilddrüsenkarzinomen konnte gezeigt werden, dass die Telomerase-Aktivität in den schnell-wachsenden UTC deutlich höher im Vergleich zu den in Struma-, Adenom oder PTC-Geweben ist [Hoang-Vu et al., 2002]. Weiter kann p45 als einzige Isoform Duplex-DNA binden [Dempsey et al., 1998].

4.1.1 Einfluss der Stimulation auf die Gesamtexpression von AUF1 in Schilddrüsenzelllinien

Die Stimulationsversuche der drei untersuchten Zelllinien zeigten mit den verwendeten Stimulantien keine eindeutige direkte Wirkung eines Signaltransduktionsweges auf die Gesamt-AUF1-Expression.

Jeder erzeugte Reiz auf die Zellen führte zu einer Erhöhung der Expression und jede Zelllinie zeigte trotz verschiedener Stimulanzien fast immer die gleiche Reaktion. Die Erhöhung der Expression lässt sich durch die neue Synthesituation der Zelle erklären, das heißt neu transkribierte RNA erfordert auch vermehrt AUF1, um diese regulieren zu können. Somit scheint die AUF1-Expression von dem Zustand und der Art der Aktivierung einer Zelle abhängig zu sein [Lal et al., 2004].

Die Zelllinie 8505C zeigte vor Stimulation die geringste Expression und danach den größten prozentualen Zuwachs. Die verschiedenen Reize, die zu einer katabolen und anabolen Aktivitätsänderung der Zelle führen, scheinen für ihre Umsetzung also eine erhöhte AUF1-Expression zu benötigen. Diese scheint umso ausgeprägter zu sein, wenn von einem niedrigen Anfangslevel ausgegangen wird (größte Steigerung in der Zelllinie 8505C). Somit scheint eine physiologische AUF1-Konzentration einer hohen Wachstumskapazität und dadurch überschießender Proliferation entgegenzuwirken und spielt so eine wichtige Rolle in der kontrollierten Umsetzung spezifischer Reize.

4.1.2 Einfluss der Stimulation auf die Isoformenzusammensetzung von AUF1

Am auffälligsten bei der Betrachtung der Isoformenzusammensetzung über 72h ist die Übereinstimmung im Verlauf. Trotz unterschiedlichster Stimulanzien und somit beeinflusster Signalwege zeigt jede Zelllinie ihr eigenes immer gleiches Bild. Für das Arbeiten von AUF1 scheinen also die Zusammensetzung und die Verhältnisse der einzelnen Isoformen zueinander das entscheidende Kriterium zu sein. Dieser Zusammenhang wurde auch schon für andere Zelllinien formuliert [Raineri et al, 2004].

Zwischen den einzelnen Zelllinien zeigen sich keine Parallelen. Weder das Ansprechen der Isoformen auf die Stimulanzien noch der Zeitpunkt der maximalen Expressionsänderung weisen Gemeinsamkeiten auf. Auch das spricht wieder für eine Reaktion je nach Zustand der Zelle und Ausgangsmengen an AUF1, um auf eine neue Situation zu reagieren.

Einfluss auf die einzelnen AUF1-Isoformen

Auch bei der Betrachtung der qualitativen und quantitativen Veränderung der Isoformen zeigen sich gleiche Verläufe innerhalb der Zelllinien, die sich zwischen den Zelllinien nicht nachweisen lassen. Die leichte Tendenz, dass TSH, Forskolin und Insulin einen stärkeren Einfluss auf die AUF1-Expression haben, ist auf Grund der

anderen Ergebnisse weniger auf einen direkten Einfluss zurückzuführen, als eher auf die durch die Stimulantien erzeugten Situationen im Stoffwechsel der Zellen.

Die Stimulationsversuche untermauern die Annahme, dass die AUF1-Isoformen nicht losgelöst von einander betrachtet werden sollten. Sowohl das „normale“ Arbeiten der Zelle als auch das Reagieren auf neue Reize und Zustände verlangt ein Zusammenspiel der vier Isoformen. Bei diesem Zusammenspiel ist das Verhältnis der Isoformen ausschlaggebend.

4.2 AUF1 in Patientengeweben

In diesem Abschnitt sollen sowohl die Ergebnisse der Westernblot-Analyse als auch die der Immunhistochemie diskutiert werden.

Mit beiden Untersuchungstechniken zeigte sich ein deutliches Gefälle in der AUF1-Gesamtexpression. Die, im Vergleich zu entarteten Geweben, sehr hohe Konzentration in Normalgeweben, spricht für die essentielle Rolle von AUF1 in der Zelle. Auch die Reihenfolge der entarteten Gewebe von normal über benigne zu maligne zeigt den großen regulatorischen Einfluss auf Zellzyklus, Proliferation und Zellstoffwechsel. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Melanozyten gefunden, die im Vergleich zu Melanomzelllinien bedeutend mehr AUF1 aufwiesen [Brewer et al., 2003]. Dadurch wurde die Halbwertszeit von beispielsweise Interleukin-10-mRNA um den Faktor zehn verlängert und somit die Zellzyklusaktivität verändert. Eindrucksvoll und beschreibend für die Rolle von AUF1 für das physiologische Arbeiten eines Organismus ist die Untersuchung von AUF1-knockout-Mäusen. Diese erlitten einen Endotoxin-Schock, da die Regulation von proinflammatorischen Cytokinen ohne AUF1 nicht mehr möglich war [Lu et al., 2006]. Im Gegensatz dazu wurde gerade in gesunden Mausorganen und speziell in schnell proliferierenden Geweben eine hohe Konzentration an AUF1 gefunden [Lu, Schneider, 2004]. Auch ein Einfluss auf die Apoptose konnte für AUF1 nachgewiesen werden [Lapucci et al., 2002]. Durch einen kompetitiven Inhibitor zu AUF1 konnte die Apoptoserate gesenkt werden [Shchors et al., 2002]. Somit erschwert ein Mangel an AUF1 den programmierten Zelltod. Dies stellt einen grundlegenden Schritt auf dem Weg einer Zelle zur Entartung da. Außer der Regulation der Apoptose spielt auch die Länge der Telomere eine Rolle für die Lebenszeit der Zelle und auch hier konnte ein Einfluss von AUF1 festgestellt werden [Enokizono et al., 2005; Ford et al., 2002].

Das oben beschriebene Gefälle von Normal zu UTC wird zwischen Adenom und FTC unterbrochen. Sowohl im Westernblot als auch im histologischen Bild ist bei der Betrachtung der Gesamt-AUF1-Expression das FTC dem Adenom näher als dem PTC und UTC. Dies ist wohl am ehesten auf die zwei großen Gruppen von FTC's, den minimal-invasiven und den hoch-invasiven Typ, zurückzuführen. Beide Typen waren in der FTC-Gruppe etwa gleich stark vertreten, wobei der minimal-invasive Typ in der Gesamtexpression im Westernblot dem Adenom und der hoch-invasive Typ dem PTC und UTC näher kommt. Für die Isoformenverteilung, also die Verhältnisse zwischen den Isoformen, sind die FTC's klarer den malignen Geweben zuzuordnen. Auch in der Immunhistochemie lassen sich Adenom und FTC durch die Verteilung der Färbung besser unterscheiden. Trotzdem sollte dieser Bereich durch weiterführende Untersuchungen mit höheren Probenzahlen genauer differenziert werden.

Durch den Westernblot konnten die vier Isoformen einzeln betrachtet werden. Hierbei verstärkt sich die Annahme, dass die Anteile der Isoformen an der Gesamtexpression das wichtigste Kriterium für die Funktion von AUF1 sind. Die Verteilung der Isoformen im Normalgewebe scheint hierbei eine Mittelstellung einzunehmen. Für die Isoform p37 liegt der Anteil im Struma und Adenom weit unter dem im Normalgewebe während er in den malignen Geweben höher liegt. In Mäusen, die die Isoform p37 überexprimierten, zeigten sich Entartungen verschiedener Organe. Dies konnte auf die Folgen einer veränderten Isoformenzusammensetzung zurückgeführt werden [Gouble et al., 2002].

Ein ähnlich klares Bild gibt es für die Isoform p42, wobei hier die Verhältnisse umgekehrt sind. Die Isoform p40 ist im Verhalten eher p37 und p45 ist eher p42 zuzuordnen. Somit lässt sich vermuten, dass auf eine Erhöhung der kleinen Isoformen eine maligne und auf Erhöhung der großen Isoformen eine benigne Entartung folgt (Abb. 29).

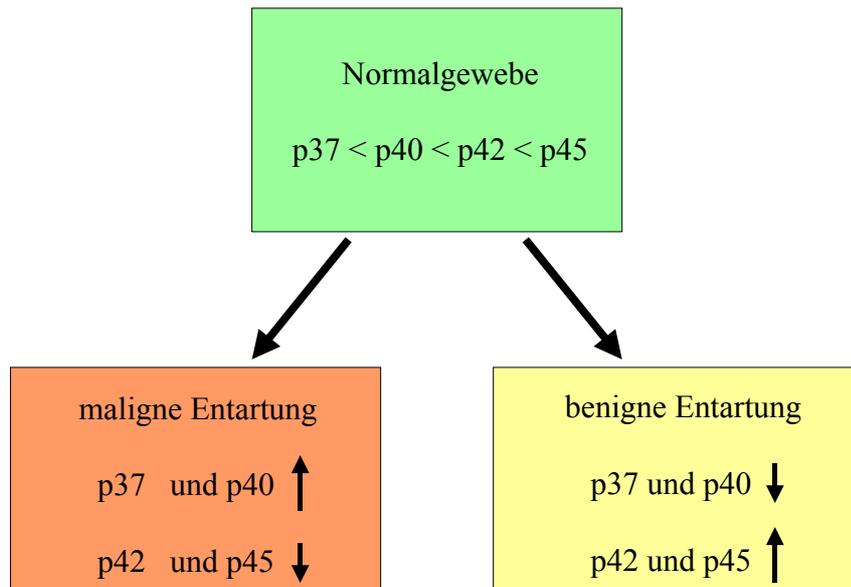


Abbildung 29: Hypothetische Verteilung der AUF1-Isoformen in humanen Geweben

So zeigten in vitro Untersuchungen, dass eine Überexpression der Isoformen p37 und p40 primär die Halbwertszeit von mRNA verkürzt und eine Überexpression der Isoformen p42 und p45 weniger die Halbwertszeit als stärker die ganze RNA Prozessierung beeinflusst, wodurch es zu einer generellen Verminderung der RNA Synthese kommt [Sarkar et al., 2003]. Das Überwiegen einer dieser Vorgänge könnte jeweils benignes oder malignes Wachstum zur Folge haben.

Als letztes Ergebnis der Westernblotuntersuchungen soll auf die quantitative Isoformenzusammensetzung eingegangen werden. Ausgehend vom Normalgewebe bis hin zum UTC ist eine Angleichung der Isoformenanteile zu erkennen. Somit verringert sich Anteil der großen Isoformen in malignen Geweben zu Gunsten der kleinen Isoformen, deren Aktivität in der Zelle dadurch zunimmt. Auch für Mäuse konnte gezeigt werden, dass ein hoher Anteil der größeren Isoformen physiologisch ist [Gouble et al., 2000]. Darüber hinaus führt hoher Anteil der Isoform p37 zu einem schnelleren mRNA Abbau [Sakar et al., 2003; Loflin et al., 1999]. Durch die starke Ubiquitinierung der beiden kleineren Isoformen [Laroia et al., 2002] sinkt aber auch die Halbwertszeit der AUF1-Population selbst und somit steht weniger AUF1-Protein für die Regulationsmechanismen zur Verfügung. So kann eine fehlende Steuerung zu einer veränderten Proteinausstattung der Zelle führen, z.B. zu einer verminderten

TNF α - und einer erhöhten c-myc-Expression, was eine Entartung von Schilddrüsengewebe bewirken kann [Cerutti et al., 1996].

Abschließend soll auf die verschiedenen Lokalisationen der AUF1-Proteine in den untersuchten Gefrierschnitten eingegangen werden. Neben der bereits besprochenen Abnahme der Gesamtexpression gibt es auch deutliche Veränderungen in der Kern-Cytosol-Verteilung. Die geringere Kernfärbung der malignen Gewebe wird teils Folge der geringeren Gesamtexpression sein, aber dies erklärt nicht warum mehr Proteine im Cytosol vorhanden sind. Mögliche Erklärungen sind, dass die wenigen vorhandenen Proteine sich im Cytosol befinden um ihre Funktion wahrnehmen zu können und die einzelnen Isoformen unterschiedliche Fähigkeiten für den Kernimport und -export besitzen. Eine mögliche Störung der Kernimportmechanismen hätte schwerwiegende Folgen für die Zelle, da gezeigt werden konnte, dass der Import von AUF1 für dessen Funktion unerlässlich ist [Chen et al., 2004; Loflin et al., 1999]. Gerade eine Akkumulation der Isoform p37 im Cytosol konnte mit einer Entartung in Verbindung gebracht werden [He, Schneider, 2006].

Somit konnte gezeigt werden, dass die physiologische und komplette AUF1-Ausstattung der proliferierenden normalen Zellen entscheidend für die Ausschaltung überflüssiger und potentiell gefährlicher Gene ist. Durch eine Verschiebung bzw. eine Verminderung der Expression kommt es zu einer gesteigerten Proliferation und zur Entartung, der die Kontrolle durch AUF1 fehlt.

5 Perspektive

Nimmt man die bisher dargestellten Sachverhalte zusammen, lässt sich ein mögliches Modell für die Schilddrüsenentartung durch Veränderung der AUF1-Proteine in der Zelle skizzieren.

Der Anteil der Isoformen p42 und p45 nimmt durch Absinken der Gesamtexpression und durch veränderte Isoformenzusammensetzung ab. Dadurch kommt es zu einer gesteigerten mRNA-Synthese. Die nun stärker vertretenen kleineren Isoformen haben ein höheres Potential zum mRNA-Abbau und bevorzugen mRNA mit ARE's der Klasse II. So kommt es beispielsweise zu einer Verminderung des Tumornekrose-Faktor α . Andere mRNA's mit ARE's der Klasse I und III hingegen werden vergleichsweise vermehrt translatiert und so kommt es zu einer Überexpression von beispielsweise c-myc oder c-jun, was wiederum eine Entartung von Schilddrüsenzellen zur Folge hat. Der fehlende Einfluss von AUF1 auf die Apoptose führt zur nötigen Proliferationssteigerung.

Als Konsequenz dieser Rolle von AUF1 und der gezeigten Ergebnisse in unterschiedlichen Schilddrüsengeweben ist AUF1 ein möglicher diagnostischer Marker für Schilddrüsenentartungen und eventuell sogar in der Sekundärprävention einsetzbar. Hierbei wäre sowohl eine molekularbiologische als auch histologische Untersuchung entsprechender Patientengewebe möglich und könnte zum Beispiel die Feinnadelaspirationsbiopsie unterstützen. Sollte ein Weg gefunden werden, die Isoformenzusammensetzung von AUF1 in vivo beeinflussen zu können, wäre sogar ein therapeutischer Einsatz denkbar. Für beide Ziele ist noch viel Forschungsarbeit nötig und es wäre interessant nachfolgende Untersuchungen nicht nur auf die Schilddrüse zu beschränken.

6 Zusammenfassung

AUF1 ist ein wichtiger Faktor in der Regulation von Zellwachstum und Zellfunktion. Bisher gibt es sehr wenige Erkenntnisse über die Rolle von AUF1 in humanen Geweben. Erstmals wurde hier die AUF1-Expression in Schilddrüsentumorzelllinien und in Schilddrüsengeweben untersucht.

In den drei untersuchten Zelllinien ließen sich alle vier Isoformen nachweisen. Besonders die Isoform p37 und p40 wiesen dabei einen großen Anteil an der Gesamtproteinmenge auf. Stimulationsversuche mit den Zelllinien konnten keine Signalkaskade aufzeigen, die einen direkten Einfluss auf die AUF1-Expression hat. Durch alle verwendeten Stimulantien ließ sich eine teils erhebliche Expressionssteigerung erzielen. Hierbei stellte sich für jede Zelllinie ein individuelles Bild in der Gesamt-AUF1-Expression und in der Isoformenzusammensetzung dar.

Mittels Westernblot- und immunhistochemischen Untersuchungen wurden Normal-, Struma-, FTC-, PTC- und UTC-Gewebe untersucht. In allen Patientengeweben konnte AUF1 mit seinen vier Isoformen nachgewiesen werden. Mit beiden Methoden zeigte sich eine Abnahme der Gesamt-AUF1-Expression von den Normalgeweben über die benignen Struma- und Adenomgewebe bis zu den maligne entarteten Patientenproben. Nicht nur die Gesamtexpression zeigte ein charakteristisches Bild für jede Entität, auch für die Isoformenverteilung konnte für jede Gewebeart ein Muster gezeigt werden. Die normalen und gutartigen Gewebe zeigten im Vergleich zu den malignen Geweben einen größeren Anteil der Isoformen p42 und p45. Für die Isoformen p37 und p40 war das Verhältnis umgekehrt.

Die histologischen Bilder zeigten eine veränderte Lokalisation der AUF1-Proteine in den entarteten Geweben im Vergleich zum Normalgewebe. Struma- und Adenomgewebe zeigten eine leicht schwächere Färbung als das Normalgewebe, aber der größte Teil der Proteine war wie bei dem Normalgewebe im Kern zu finden. Bei den malignen Geweben hingegen zeigte sich eine wesentlich schwächere Färbung und die meisten Proteine waren im Cytosol lokalisiert, so dass bei den PTC- und UTC-Geweben die Kerne fast keine Färbung mehr aufwiesen.

Somit konnte für AUF1 gezeigt werden, dass es eine wichtige Rolle in der Schilddrüse spielt und eine verminderte Expression mit Entartung einherzugehen

scheint. Wichtig ist dabei nicht nur Gesamtmenge an Protein, sondern auch die Anteile der einzelnen Isoformen. Wie schon für andere Organismen beschrieben, ist in einem Normalzustand die Gesamtexpression hoch und die Anteile der Isoformen p42 und p45 größer als die Anteile der Isoformen p37 und p40. Die dargestellten Daten der AUF1-Expression in Schilddrüsengeweben zeigen einen möglichen diagnostischen Einsatz und somit sollte AUF1 weiter Gegenstand intensiver Forschung sein.

Literaturverzeichnis

- 1 Bakheet T, Frevel M, Williams BR, Greer W, Khabar KS**
ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic Acids Res.* 2001 Jan 1;29(1):246-54
- 2 Bashirullah A, Cooperstock RL, Lipshitz HD**
Spatial and temporal control of RNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jun 19;98(13):7025-8. Review
- 3 Becker HD**
Seltener Formen der Schilddrüsenmalignome. In: Becker HD, Heinze HG, editors. *Maligne Schilddrüsentumoren.* Berlin, Heidelberg, New York, Tokio: Springer-Verlag; 1984. p. 250-3
- 4 Bradford MM**
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54
- 5 Brewer G, Sacconi S, Sarkar S, Lewis A, Pestka S**
Increased interleukin-10 mRNA stability in melanoma cells is associated with decreased levels of A + U-rich element binding factor AUF1. *J Interferon Cytokine Res.* 2003 Oct;23(10):553-64
- 6 Brown CE, Sachs AB.**
Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Mol Cell Biol.* 1998 Nov;18(11):6548-59.
- 7 Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y**
Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem.* 1982 Jul 10;257(13):7847-51
- 8 Cerutti J, Trapasso F, Battaglia C, Zhang L, Martelli ML, Visconti R, Berlingieri MT, Fagin JA, Santoro M, Fusco A**
Block of c-myc expression by antisense oligonucleotides inhibits proliferation of human thyroid carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res.* 1996 Jan;2(1):119-26
- 9 Chen CY, Shyu AB**
AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci.* 1995 Nov;20(11):465-70. Review

- 10 Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Raijmakers R, Pruijn GJ, Stoecklin G, Moroni C, Mann M, Karin M**
AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell*. 2001 Nov 16;107(4):451-64
- 11 Chen CY, Xu N, Zhu W, Shyu AB**
Functional dissection of hnRNP D suggests that nuclear import is required before hnRNP D can modulate mRNA turnover in the cytoplasm. *RNA*. 2004 Apr;10(4):669-80
- 12 Chow S-M, Law St C K, Mendenhall W M, Au S-K, Yau St, Yuen K-T, Law C-C, Lau W-H**
Follicular thyroid carcinoma: prognostic factors and the role of Radioiodine; *Cancer*, 2002, 95 (3): 488-98
- 13 Chung SY, Wooley J**
Set of novel, conserved proteins fold pre-messenger RNA into ribonucleosomes. *Proteins*. 1986 Nov;1(3):195-210
- 14 Coburn M C, Wanebo H J**
Age correlates with increased frequency of high risk factors in elderly patients with thyroid cancer; *Am J Surg*, 1995, 170 (5): 471-5
- 15 DeMaria CT, Brewer G**
AUF1 binding affinity to A+U-rich elements correlates with rapid mRNA degradation. *J Biol Chem*. 1996 May 24;271(21):12179-84
- 16 Dempsey LA, Li MJ, DePace A, Bray-Ward P, Maizels N**
The human HNRPD locus maps to 4q21 and encodes a highly conserved protein. *Genomics*. 1998 May 1;49(3):378-84
- 17 Dreyfuss G**
Structure and function of nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein particles. *Annu Rev Cell Biol*. 1986;2:459-98. Review
- 18 Durrant I, Fowler S**
Nonradioactive oligonucleotide probe labelling. *Methods Mol Biol*. 1994;31:163-75. Review
- 19 Enokizono Y, Konishi Y, Nagata K, Ouhashi K, Uesugi S, Ishikawa F, Katahira M**
Structure of hnRNP D complexed with single-stranded telomere DNA and unfolding of the quadruplex by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D. *J Biol Chem*. 2005 May 13;280(19):18862-70
- 20 Eversole A, Maizels N**
In vitro properties of the conserved mammalian protein hnRNP D suggest a role in telomere maintenance. *Mol Cell Biol*. 2000 Aug;20(15):5425-32

- 21 Fabien N, Fusco A, Santoro M, Barbier Y, Dubois PM, Paulin C**
Description of a human papillary thyroid carcinoma cell line. Morphologic study and expression of tumoral markers. *Cancer*. 1994 Apr 15;73(8):2206-12
- 22 Franceschi S, Boyle P, Maisonneuve P, La Vecchia C, Burt AD, Kerr DJ, et al.**
The epidemiology of thyroid carcinoma. *Critical Reviews Oncogenesis* 1993;4:25-52.
- 23 Ford LP, Wright WE, Shay JW**
A model for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in telomere and telomerase regulation. *Oncogene*. 2002 Jan 21;21(4):580-3. Review
- 24 Gerard C, McPhail LC, Marfat A, Stimler-Gerard NP, Bass DA, McCall CE**
Role of protein kinases in stimulation of human polymorphonuclear leukocyte oxidative metabolism by various agonists. Differential effects of a novel protein kinase inhibitor. *J Clin Invest*. 1986 Jan;77(1):61-5
- 25 Goerges R**
The changing epidemiology of thyroid cancer. In: Biersack H-J, Grünwald F (Hrgs.): *thyroid cancer*, 1. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (u.s.w.), 2001, S. 3-25
- 26 Goretzki PE, Frilling A, Simon D, Roeher HD**
Growth regulation of normal thyroids and thyroid tumors in man. *Recent Results Cancer Res*. 1990;118:48-63
- 27 Gouble A, Morello D**
Synchronous and regulated expression of two AU-binding proteins, AUF1 and HuR, throughout murine development. *Oncogene*. 2000 Nov 9;19(47):5377-84
- 28 Gouble A, Grazide S, Meggetto F, Mercier P; Delsol G, Morello D**
A new player in oncogenesis: AUF1/hnRNPD overexpression leads to tumorigenesis in transgenic mice. *Cancer Res*. 2002 Mar 1;62(5):1489-95
- 29 Guhaniyogi J, Brewer G**
Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene*. 2001 Mar 7;265(1-2):11-23
- 30 He C, Schneider R**
14-3-3sigma is a p37 AUF1-binding protein that facilitates AUF1 transport and AU-rich mRNA decay. *EMBO J*. 2006 Aug 23;25(16):3823-31
- 31 Hoang-Vu C, Boltze C, Gimm O, Poremba C, Dockhorn-Dworniczak B, Köhrle J, Rath FW, Dralle H.**
Expression of telomerase genes in thyroid carcinoma. *Int J Oncol*. 2002 Aug;21(2):265-72

- 32 Hofstaedter F**
Histopathology, immunohistochemistry and molecular biology. In: Biersack H-J, Grünwald F (Hrsg.): thyroid cancer, 1. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (u.s.w.), 2001, S. 27-53
- 33 Ito T, Seyama T, Hayashi Y, Hayashi T, Dohi K, Mizuno T, Iwamoto K, Tsuyama N, Nakamura N, Akiyama M**
Establishment of two human thyroid carcinoma cell lines (8305C, 8505C) bearing p53 gene mutations. *Int. J. Oncology*, 4: 583-586, 1994
- 34 Jansen RP**
mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Apr;2(4):247-56. Review.
- 35 Katahira M, Miyanoiri Y, Enokizono Y, Matsuda G, Nagata T, Ishikawa F, Uesugi S**
Structure of the C-terminal RNA-binding domain of hnRNP D0 (AUF1), its interactions with RNA and DNA, and change in backbone dynamics upon complex formation with DNA. *J Mol Biol.* 2001 Aug 31;311(5):973-88
- 36 Korner CG, Wormington M, Muckenthaler M, Schneider S, Dehlin E, Wahle E.**
The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of Xenopus oocytes. *EMBO J.* 1998 Sep 15;17(18):5427-37
- 37 Laemmli UK**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5
- 38 Lagnado CA, Brown CY, Goodall GJ**
AUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of an mRNA: the functional sequence within AU-rich elements may be UUAUUUA(U/A)(U/A). *Mol Cell Biol.* 1994 Dec;14(12):7984-95
- 39 Lal A, Mazan-Mamczarz K, Kawai T, Yang X, Martindale JL, Gorospe M**
Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *EMBO J.* 2004 Aug 4;23(15):3092-102. Epub 2004 Jul 15
- 40 Lapucci A, Donnini M, Papucci L, Witort E, Tempestini A, Bevilacqua A, Nicolini A, Brewer G, Schiavone N, Capaccioli S**
AUF1 is a bcl-2 A + U-rich element-binding protein involved in bcl-2 mRNA destabilization during apoptosis. *J Biol Chem.* 2002 May 3;277(18):16139-46

- 41 Laroia G, Schneider RJ**
Alternate exon insertion controls selective ubiquitination and degradation of different AUF1 protein isoforms. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jul 15;30(14):3052-8
- 42 Lindl T, Bauer J**
Zell- und Gewebekultur, 2. Auflage, Gustav-Fischer-Verlag, Lübeck, Stuttgart, Jena (usw.), 1989, S. 55-74
- 43 Loflin P, Chen CY, Shyu AB**
Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev.* 1999 Jul 15;13(14):1884-97
- 44 Lu JY, Schneider RJ**
Tissue distribution of AU-rich mRNA-binding proteins involved in regulation of mRNA decay. *J Biol Chem.* 2004 Mar 26;279(13):12974-9
- 45 Lu JY, Sadri N, Schneider RJ**
Endotoxic shock in AUF1 knockout mice mediated by failure to degrade proinflammatory cytokine mRNAs. *Genes Dev.* 2006 Nov 15;20(22):3174-84
- 46 Mazzaferri EL, Jhiang SM**
Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *The American Journal of Medicine* 1994;97:418-28
- 47 Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G**
Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.* 2002;3(3):REVIEWS0004. Epub 2002 Feb 28. Review
- 48 Moraes KC, Quaresma AJ, Maehnss K, Kobarg J**
Identification and characterization of proteins that selectively interact with isoforms of the mRNA binding protein AUF1 (hnRNP D). *Biol Chem.* 2003 Jan;384(1):25-37
- 49 Mukherjee D, Gao M, O'Connor JP, Raijmakers R, Pruijn G, Lutz CS, Wilusz J**
The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.* 2002 Jan 15;21(1-2):165-74
- 50 Ordonez N G, El-Naggar A K, Hickey RC, Samaan N**
Anaplastic thyroid carcinoma. Immunocytochemical study of 32 cases; *Am J Pathol*, 1991, 96 (1): 15-24
- 51 Peng SS, Chen CY, Shyu AB**
Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c-jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements. *Mol Cell Biol.* 1996 Apr;16(4):1490-9

- 52 Pesole G, Mignone F, Gissi C, Grillo G, Licciulli F, Liuni S.**
Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene*. 2001 Oct 3;276(1-2):73-81.
- 53 Pioli PA, Hamilton BJ, Connolly JE, Brewer G, Rigby WF**
Lactate dehydrogenase is an AU-rich element-binding protein that directly interacts with AUF1. *J Biol Chem*. 2002 Sep 20;277(38):35738-45
- 54 Raineri I, Wegmueller D, Gross B, Certa U, Moroni C**
Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference. *Nucleic Acids Res*. 2004 Feb 19;32(4):1279-88
- 55 Rosai J, Carcangiu M L, DeLellis R**
Follicular carcinoma. tumors of the thyroid gland, Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C., 1992a, S. 49-63
- 56 Rosai J, Carcangiu M L, DeLellis R**
Papillary carcinoma. tumors of the thyroid gland, Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C., 1992b, S. 65-96
- 57 Rosai J, Carcangiu M L, DeLellis R**
Undifferentiated (anaplastic) carcinoma. tumors of the thyroid gland, Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C., 1992c, S. 135-59
- 58 Salinovich O, Montelaro, R C**
Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 1986, 156 (2): 341-7
- 59 Sambrook J, Gething MJ**
Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*. 1989 Nov 16;342(6247):224-5
- 60 Sarkar B, Xi Q, He C, Schneider RJ**
Selective degradation of AU-rich mRNAs promoted by the p37 AUF1 protein isoform. *Mol Cell Biol*. 2003 Sep;23(18):6685-93
- 61 Seifert R, Hilgenstock G, Fassbender M, Distler A**
Regulation of the superoxide-forming NADPH oxidase of human neutrophils is not altered in essential hypertension. *J Hypertens*. 1991 Feb;9(2):147-53
- 62 Schmid K W**
Schilddrüsenkarzinom. *Praxis*, 1998, 87: 367-74

- 63 Schmutzler C, Köhrle J**
Retinoic acid redifferentiation therapy for thyroid cancer. *Thyroid*. 2000 May;10(5):393-406
- 64 Shchors K, Yehiely F, Kular RK, Kotlo KU, Brewer G, Deiss LP**
Cell death inhibiting RNA (CDIR) derived from a 3'-untranslated region binds AUF1 and heat shock protein 27. *J Biol Chem*. 2002 Dec 6;277(49):47061-72
- 65 Suzuki Y, Lehrer RI**
NAD(P)H oxidase activity in human neutrophils stimulated by phorbol myristate acetate. *J Clin Invest*. 1980 Dec;66(6):1409-18
- 66 Towbin H, Staehelin T, Gordon J**
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology*. 1979;24:145-9
- 67 Towbin H, Staehelin T, Gordon J**
Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1989 Aug;27(8):495-501. Review
- 68 van der Velden AW, Thomas AA.**
The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 Jan;31(1):87-106. Review
- 69 Venkatesh Y S, Ordonez N G, Schultz P N, Hickey R C, Goepfert H, Samaan N**
Anaplastic carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 121 cases. *Cancer*, 1990, 66 (2): 321-30
- 70 Wagner BJ, Long L, Rao PN, Pettenati MJ, Brewer G**
Localization and physical mapping of genes encoding the A+U-rich element RNA-binding protein AUF1 to human chromosomes 4 and X. *Genomics*. 1996 Jun 1;34(2):219-22
- 71 Wagner BJ, DeMaria CT, Sun Y, Wilson GM, Brewer G**
Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics*. 1998 Mar 1;48(2):195-202
- 72 Wilson GM, Lu J, Sutphen K, Sun Y, Huynh Y, Brewer G**
Regulation of A + U-rich element-directed mRNA turnover involving reversible phosphorylation of AUF1. *J Biol Chem*. 2003 Aug 29;278(35):33029-38. Epub 2003 Jun 19
- 73 Wynford-Thomas D**
Growth factors and oncogenes. In: Wheeler MH, Lazarus JH (eds) *Diseases of the Thyroid*. London: Chapman and Hall, 1994 pp299-322

74 Xu N, Chen CY, Shyu AB

Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover. *Mol Cell Biol.* 2001 Oct;21(20):6960-71

75 Zhang W, Wagner BJ, Ehrenman K, Schaefer AW, DeMaria CT, Crater D, DeHaven K, Long L, Brewer G

Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Mol Cell Biol.* 1993 Dec;13(12):7652-65

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellen:

Tabelle 1:	Entitäten mit der jeweiligen Anzahl der im Westernblot untersuchten Gewebe	17
Tabelle 2:	Entitäten mit der jeweiligen Anzahl der immunhistochemisch untersuchten Gewebe	17
Tabelle 3:	Verwendete Stimulantien und deren Konzentration	19
Tabelle 4:	Zusammensetzung des Proteinextraktionspuffers	20
Tabelle 5:	Zusammensetzungen der Gele	22
Tabelle 6:	Stammlösung für den Ladepuffer nach Laemmli (1970), die Stammlösung wurde im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest. vermischt, um den Laemmli-Loading-Puffer zu erhalten	23
Tabelle 7:	Auswertung der Schnitte anhand des SI-Index	30
Tabelle 8:	Wirkung der Stimulantien auf die Expression der Isoformen (Ereignisse mit erhöhter Expression : Ereignisse mit verminderter Expression).....	41
Tabelle 9:	Ergebnisse der Immunhistochemie nach dem SI-Index	52

Abbildungen:

Abbildung 1:	Schematische Darstellung menschlicher reifer mRNA.....	5
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der vier AUF1-Isoformen mit entsprechend unterschiedlich translatierten Exons	8
Abbildung 3:	Beispiele für die Lokalisation von AUF1	9
Abbildung 4:	links: schematische Darstellung einer Elektrophorese, rechts: Bild einer Elektrophoreseapparatur	23
Abbildung 5:	Schichtaufbau für das Semidry-Blotting	24
Abbildung 6:	Beispiel für eine PVDF-Membran nach Ponceau S Färbung, rechts und links ist der Massenmarker aufgetragen, in den mittleren Slots sind die Proben der Gesamtproteine zu sehen.	25
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der Antikörperdetektion und der Chemilumineszenz	27
Abbildung 8:	Beispiel einer Antikörperfärbung nach Westernblot. Zu sehen sind die vier detektierten Isoformbanden und die Bande des Normalisierungsmarkers, sowie des Massenmarker (MM), gefolgt von der Kontrollprobe und den stimulierten Proben.....	28
Abbildung 9:	Westernblot der Proteine der unbehandelten Zelllinien zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Mit p37, p40, p42, p45 sind die AUF1-Isoformen gekennzeichnet.....	31
Abbildung 10:	AUF1-Isoformenanteile in den untersuchten unbehandelten Zelllinien.....	32
Abbildung 11:	Detektierte Banden der AUF1-Isoformen der drei untersuchten Zelllinien; jeweils nach 24, 48 und 72h	33
Abbildung 12:	Verringerte und erhöhte Expression von AUF1 in den untersuchten Zelllinien nach 24, 48 und 72h, ausgewertet gegen die Kontrolle = 0%.....	35
Abbildung 13:	AUF1-Isoformenanteile der Zelllinie 8505C nach Stimulation über 24, 48 und 72h; K = Kontrolle	37
Abbildung 14:	AUF1-Isoformenanteile der Zelllinie B-CPAP nach Stimulation über 24, 48 und 72h; K = Kontrolle	38
Abbildung 15:	AUF1-Isoformenanteile der Zelllinie FTC-133 nach Stimulation über 24, 48 und 72h; K = Kontrolle	40

Abbildung 16:	Verringerte und erhöhte Expression der Auf1-Isoformen nach Stimulation in %; Die Angaben beziehen sich auf den Zuwachs der Ausgangsgesamtexpression.....	43
Abbildung 17:	Detektierte Banden nach Antikörperfärbung; geordnet nach Entitäten; jeweils rechts sind exemplarisch die Isoformen gekennzeichnet	44
Abbildung 18:	Vergleich der Gesamt-AUF1-Expression der untersuchten Entitäten	45
Abbildung 19:	Isoformenanteile an der Gesamt-AUF1-Expression der einzelnen Gewebearten	47
Abbildung 20:	Anteile der AUF1-Isoformen aller untersuchten Entitäten in zwei verschiedenen Darstellungen	48
Abbildung 21:	Beispiel für Negativkontrollen eines Normalgewebe- und eines UTC-Gewebegefrierschnittes.....	49
Abbildung 22:	Normalgewebe in 40- und 100-facher Vergrößerung	49
Abbildung 23:	Strumagewebe in 40- und 100-facher Vergrößerung	50
Abbildung 24:	Adenomgewebe in 40- und 100-facher Vergrößerung	50
Abbildung 25:	FTC-Gewebe in 40- und 100-facher Vergrößerung.....	51
Abbildung 26:	PTC-Gewebe in 40- und 100-facher Vergrößerung	51
Abbildung 27:	UTC-Gewebe in 40- und 100-facher Vergrößerung	52
Abbildung 28:	Übersicht der nachgewiesenen Wirkungen von AUF1	54
Abbildung 29:	Hypothetische Verteilung der AUF1-Isoformen in humanen Geweben.....	59

Thesen

1. Ziel der Arbeit war die Expression des AUF1-Proteins erstmals in der Schilddrüse zu untersuchen.
2. AUF1 ließ sich in den drei verwendenden Zelllinien und allen untersuchten Patientengeweben nachweisen.
3. In den mittels Westernblotanalysen untersuchten Proben konnten jeweils alle vier Isoformen dargestellt werden, somit lässt sich ein Fehler in der AUF1-Prozessierung ausschließen.
4. Durch Stimulation der Zelllinien wurde mit allen Stimulantien eine Überexpression von AUF1 erreicht.
5. Trotz verschiedener Stimulantien zeigte sich innerhalb der Zelllinien ein konstantes Bild der Isoformenexpression über 72h. Somit konnte keine direkte Wirkung auf die AUF1-Expression gefunden werden und die Überexpression ist als Reaktion auf die neue Situation im RNA-Stoffwechsel der Zelle zu sehen.
6. In den Patientengeweben zeigt sich sowohl in der Westernblotuntersuchung als auch im histologischen Bild ein deutliches Gefälle in der Gesamt-AUF1-Expression von den Normalgeweben über Struma und Adenom zu den malignen Entartungen.
7. Für jede untersuchte Entität zeigte sich eine typische Isoformenzusammensetzung. Die Normalgewebe nehmen hier eine Mittelstellung ein und so zeigte sich in benignen Geweben ein größerer Anteil

der Isoformen p42 und p45 und in malignen Geweben ein größerer Anteil der Isoformen p37 und p40.

8. Auch für die Lokalisation der AUF1-Proteine zeigt sich ein typisches Bild für jede untersuchte Entität. So zeigte sich in dem normalen und den benignen Geweben der größte Teil der Proteine im Kern und in den malignen Geweben im Cytosol.
9. Es zeigt sich, dass AUF1 ein essenzielles Protein für die Schilddrüse ist und in unphysiologischen Schilddrüsengeweben weniger AUF1 und eine veränderte Isoformenzusammensetzung auftreten.
10. Die Rolle und genaue Funktion von AUF1 wird aktuell noch stark diskutiert, doch sollte ein Protein, welches in der Art wichtige Prozesse in der Genexpression eingreift weitergehend untersucht werden.
11. Die deutlichen Unterschiede in der AUF1-Expression in den verschiedenen Entitäten macht AUF1 als Marker für Schilddrüsenentartungen interessant.
12. Besteht durch eine induzierte Erhöhung der AUF1-Expression die Möglichkeit einer Entartung entgegenzuwirken?

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Lars Brodauf
Adresse: Ernst-Schneller-Str. 5
06114 Halle/Saale
Telefon: 0049 176-21913815
e-mail-Adresse: lars.brodauf@medizin.uni-halle.de
Geburtsdaten: 06.01.1982 in Freiberg/Sachsen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung/Studium

1988-1992 Oberschule W. I. Lenin (Grundschule) in Freiberg
1992-2000 Ulrich-Rülein-Gymnasium Freiberg
Abschluss: Abitur
Ab Oktober 2001 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
September 2003 Ablegen des Physikums für das Studium der Humanmedizin
Ab August 2006 Student im Praktischem Jahr an dem Universitätsklinikum
Kröllwitz und dem Martha-Maria-Krankenhaus Halle-Dölau
Ab Oktober 2003 Doktorand in der Gruppe von Herrn PD Dr. Hoang-Vu,
Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und
Gefäßchirurgie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Selbstständigkeitserklärung

Gemäß §6 der Promotionsordnung der Universität Halle erkläre ich hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Frühere Promotionsversuche bestehen nicht. Die vorliegende Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle, den 10.10.2007

Lars Brodauf

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe Experimentelle und Chirurgische Onkologie an der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Dem Klinikdirektor Herrn Professor Dr. med. Henning Dralle gilt mein Dank für die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten und die Überlassung dieses sehr spannenden Themas.

Meinem Betreuer und Leiter der Arbeitsgruppe Herrn PD Dr. Cuong Hoang-Vu danke ich sehr herzlich für die wissenschaftliche und individuelle Betreuung, sowie die stetige Diskussionsbereitschaft und jederzeitige Bereitschaft mir bei allen Fragen zur Seite zu stehen.

Dem Team des ECHO-Labors und Frau Kathrin Hammje danke ich sehr für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit, sowie die stetige Hilfsbereitschaft bei methodischen und wissenschaftlichen Fragen.

Herrn Dr. Carsten Sekulla danke ich sehr für die Beantwortung all meiner Computer- und Statistikfragen.

Meiner Familie und Freunden gilt der Dank für die moralische Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.