

Analyse der Statin-vermittelten Regulation der PIM1 Kinase in Krebszellen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Aileen Weißer

aus **Wolfen**

Marburg/Lahn **2019**

Erstgutachter: **Prof. Dr. Arnold Grünweller**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Achim Aigner**

Eingereicht am **13.05.2019**

Tag der mündlichen Prüfung am **24.06.2019**

Hochschulkennziffer: 1180

Inhaltsverzeichnis

Summary.....	I
1. Einleitung	1
1.1 Krebs	1
1.1.2 Karzinogenese.....	1
1.1.3 Proto-Onkogene, Tumorsuppressorgene und Stabilitätsgene	2
1.1.4 Behandlung von Krebs.....	3
1.2 Statine	4
1.2.1 Der Einfluss von Statinen auf den Mevalonatweg	5
1.2.2 Der Einfluss von Statinen auf endogene Cholesterinbiosynthese und den Cholesterinspiegel im Blut	5
1.2.3 Der Einfluss von Statinen auf Krebszellen	6
1.2.4 Hemmung der Proliferation durch Statine	7
1.2.5 Förderung der Apoptose durch Statine	8
1.2.6 Hemmung der Angiogenese durch Statine.....	8
1.2.7 Hemmung der Tumorinvasion und Metastasenbildung durch Statine.....	9
1.3 Die PIM1 Kinase	9
1.3.1 Regulation von <i>Pim-1</i> auf transkriptioneller Ebene.....	10
1.3.2 Regulation von <i>Pim-1</i> auf posttranskriptioneller Ebene	11
1.3.3 Regulation von <i>Pim-1</i> auf translationeller Ebene.....	11
1.3.4 Regulation von PIM1 auf posttranslationeller Ebene	12
1.3.5 Das Potential von PIM1 als Zielmolekül in der Krebstherapie	13
1.3.6 Regulation der Apoptose durch PIM1.....	14
1.3.7 Regulation des Zellzyklus durch PIM1	15
1.4 Monozyten und Makrophagen.....	17
1.4.1 Die Heterogenität von Makrophagen.....	18
1.4.2 Regulation des Differenzierungsprozesses von Makrophagen	19
1.5 Zielstellung	20
2. Material und Methoden.....	22
2.1 Allgemeine Materialien.....	22
2.2 Primer	22
2.3 Antikörper	22
2.4 Größenmarker	24
2.5 Plasmide.....	24
2.5.1 pCMV6-XL4 PIM1 cDNA Konstrukt.....	24

2.5.1.1 pCMV6-XL4 PIM1 Δ 3'-UTR cDNA Konstrukt.....	24
2.5.1.2 pCMV6-XL4 PIM1 3'mut33a cDNA Konstrukt.....	25
2.5.2 pFR_HCV_xb Luciferase-Reporter Konstrukte.....	25
2.5.2.1 pFR_HCV_xb Plasmid ohne HSV TK-Promotor	26
2.5.2.2 Wildtyp Pim-1 STAT3 BS Promotor-Konstrukt.....	27
2.5.2.3 Pim-1 STAT3 BS mut Promotor-Konstrukt	28
2.5.2.4 Pim-1 STAT3 BS mut2 Promotor-Konstrukt	29
2.6 Bakterielle Zellkultur.....	30
2.6.1 Bakterienstämme	30
2.6.2 Kultivierung von Bakterien auf Agarplatten.....	31
2.6.3 Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedium	31
2.6.4 Präparation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> DH5 α Zellen.....	31
2.6.5 Transformation von Bakterien	32
2.7 Zellkultur adhärenter, humaner Zellen.....	32
2.7.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien	32
2.7.2 Bestimmung der Zellzahl.....	33
2.7.3 HeLa Zellen	33
2.7.4 HepG2 Zellen.....	33
2.7.5 LS174T Zellen	34
2.7.6 Skov3 Zellen	34
2.7.7 Isolierung von PBMCs.....	34
2.7.8 Isolierung von Monozyten aus PBMCs.....	35
2.7.8.1 Elutriation.....	35
2.7.8.2 CD14 Magnetic Beads	36
2.7.9 Kultivierung primärer Zellen	36
2.7.10 Ernte humaner Zelllinien und primärer Zellen.....	37
2.7.11 Simvastatin-Behandlung humaner Zelllinien und primärer Zellen.....	37
2.7.12 Mevalonat-Behandlung humaner Zelllinien	38
2.7.13 Inhibition der Transkription in humanen Zelllinien.....	38
2.7.14 Inhibition der Translation in humanen Zelllinien.....	38
2.7.15 Inhibition des Proteinabbaus in humanen Zelllinien.....	39
2.7.16 Transfektion humaner Zelllinien	39
2.8 Protein Techniken.....	40
2.8.1 SDS PAGE	40
2.8.2 Western Blot	41
2.8.3 Dual-Luciferase Reporter Assay	43
2.9 Allgemeine Nukleinsäure-Techniken.....	43

2.9.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	43
2.9.2	Gelelektrophorese.....	44
2.9.2.1	Agarosegelelektrophorese	45
2.10	RNA Techniken.....	45
2.10.1	RNA-Präparation.....	45
2.11	DNA Techniken.....	46
2.11.1	Plasmid Präparation.....	46
2.11.2	Isolierung genomischer DNA aus Humanzellen	46
2.11.3	5'-OH-Phosphorylierung von DNA	46
2.11.4	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	47
2.11.5	<i>DpnI</i> -Verdau von Plasmid-DNA.....	48
2.11.6	Klenow-Fragment.....	48
2.11.7	Ligation von Plasmid-DNA	49
2.11.8	Gibson-Assembly	50
2.11.9	Reverse Transkription	51
2.11.10	PCR.....	52
2.11.10.1	Amplifizierung genomischer DNA.....	53
2.11.10.2	Amplifizierung des pFR_HCV_xb Plasmides	54
2.11.10.3	<i>In vitro</i> Mutagenese.....	55
2.11.10.4	Kolonie-PCR	57
2.11.10.5	Quantitative Echtzeit-PCR.....	58
2.11.11	Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach PCR und Restriktionsverdau	60
2.11.12	DNA Sequenzierung	60
2.12	Software	61
2.12.1	Quantifizierung von Western Blots	61
2.12.2	NCBI	61
2.12.3	Vorhersage von Transkriptionsfaktor-Bindestellen	61
2.12.3.1	<i>Homer</i>	61
2.12.3.2	ALGGEN.....	62
2.12.4	SnapGene.....	62
3.	Ergebnisse	63
3.1	Charakterisierung der Statin-vermittelten Regulation der PIM1 Kinase in Krebszellen.....	63
3.1.1	Analyse des Statin-vermittelten <i>Pim-1</i> Knockdowns auf transkriptioneller Ebene	65
3.1.2	Analyse des Statin-vermittelten <i>Pim-1</i> Knockdowns auf posttranskriptioneller Ebene	71

3.1.3 Analyse des Statin-vermittelten <i>Pim-1</i> Knockdowns auf translationeller Ebene	74
3.1.4 Analyse des Statin-vermittelten PIM1 Knockdowns auf posttranslationeller Ebene hinsichtlich des Proteinabbaus	84
3.2 Analyse der Funktion von PIM1 in primären Zellen	91
4. Diskussion.....	98
4.1 Sind Statine geeignete Medikamente für den Einsatz in der Krebstherapie?.....	98
4.2 Wird der Statin-vermittelte PIM1 Knockdown über die transkriptionelle Ebene reguliert?.....	102
4.3 Wird der Statin-vermittelte PIM1 Knockdown über die posttranskriptionelle Ebene reguliert?.....	104
4.4 Wird der Statin-vermittelte PIM1 Knockdown über die translationelle Ebene reguliert?.....	107
4.5 Wird der Statin-vermittelte PIM1 Knockdown über die posttranslationelle Ebene reguliert?.....	111
4.6 Fazit zum Statin-vermittelten Knockdown der PIM1 Kinase in Krebszellen	114
4.7 Mögliche Funktion von PIM1 in Monozyten und Makrophagen.....	116
Quellenverzeichnis	III
Anhang.....	XV
Abkürzungsverzeichnis.....	XIX
Danksagung	XX
Erklärung.....	XXI
Lebenslauf.....	XXII

Summary

The constitutively active serine/threonine kinase PIM1 is a prosurvival kinase, which contributes to the viability of cancer cells by regulating essential cellular processes such as cell cycle, cell growth, differentiation and apoptosis. This proto-oncogene is overexpressed in many types of cancer, including lymphoma, leukemia and solid tumors of the liver and colon. In addition, PIM1 can induce the formation of metastases by influencing the migration of cancer cells. Thus, high PIM1 levels are often associated with poor tumor prognosis. Since PIM1 acts as a master regulator of many signaling pathways and its knockout in mice only leads to a slightly altered phenotype, it is a promising target molecule for cancer therapy.

Preliminary studies have shown that PIM1 can be downregulated by statins in cancer cells. Statins function as competitive inhibitors of HMG-CoA reductase, the key enzyme of the mevalonate pathway. The drug is available on the market for lowering cholesterol levels in the blood as it inhibits cholesterol synthesis. In addition, statins act by reducing the production of isoprenoids, which results in an attenuation of membrane anchoring of GTPases like Ras, Rac and Rho. This influences important signaling pathways and engenders in the promotion of apoptosis as well as the inhibition of proliferation, angiogenesis, tumor invasion and metastasis formation in various tumor types. Furthermore, clinical studies have shown that the risk of undesirable, harmful side effects from statins appears to be relatively low compared to the benefits that can be obtained from statin therapy. For this reason, statins may have also the potential to become promising drugs for the treatment of tumors. The molecular regulatory mechanisms induced by statin treatment in cancer cells are not well understood. Consequently, our observations that statins can mediate a PIM1 knockdown, provide the basis for the first project in this thesis, in which the regulatory mode of action of simvastatin on PIM1 was investigated. Therefore, different analyses were performed on transcriptional, post-transcriptional, translational and posttranslational levels in the cancer cell lines HepG2, LS174T and Skov3.

Statin-induced PIM1 knockdown appears to be the result of altered regulatory mechanisms, as evidenced by the relatively late onset of action of simvastatin after 36 hours at the mRNA level and 48 hours at the protein level. The RT-qPCR experiments showed a similar decrease in *Pim-1* mRNA levels in liver (HepG2) and colon (LS174T) carcinoma cell line, respectively. Whereas the Western blot results indicated that the

protein levels of PIM1 in HepG2 cells are significantly lower than in LS174T cells after simvastatin treatment. They further revealed that simvastatin-mediated inhibition of PIM1 is not regulated by proteasomal or lysosomal protein degradation in both cell lines. Furthermore, statin-induced down-regulation of *Pim-1* can also be excluded at the transcriptional level, as demonstrated by the dual luciferase assay performed after transfection of *Pim-1* promoter constructs in HepG2 cells and the Western blot after ectopic expression of PIM1 in Skov3 cells. Instead, the RT-qPCR experiment on the inhibition of transcriptional initiation in the liver carcinoma cell line suggests regulation via the posttranscriptional level by *Pim-1* mRNA turnover. In addition, in HepG2 and LS174T cells a statin-mediated knockdown of PIM1 seems to be regulated at the translational level, illustrated by the approaches on the inhibition of translation elongation. Further analyses indicated that the statin effect at this level is specific for PIM1 in HepG2 cells, whereas a non-specific mode of action of simvastatin can be suggested in the colon cancer cell line.

In the second project, the role of PIM1 during differentiation of blood monocytes into macrophages was analyzed. Therefore, monocytes were isolated from donor blood and differentiated into M1 macrophages, which trigger an anti-tumor response of the immune system. To analyze the function of PIM1 as a putative regulator of differentiation, the *Pim-1* mRNA and protein levels were investigated at the various developmental stages. The RT-qPCR experiments showed that the *Pim-1* mRNA levels oscillate over the entire analyzed period of time of monocytes to the complete maturity of macrophages. An increase in mRNA levels could be observed at the beginning of differentiation process, which decreases towards the end of it. The investigations of the Western blots revealed that, along with the *Pim-1* mRNA levels, the protein levels were also enhanced during the differentiation period of the macrophages. This confirms the assumption that PIM1 may play a role in regulating the differentiation of monocytes.

1. Einleitung

1.1 Krebs

Krebs bezeichnet eine chronische Erkrankung, die durch unkontrollierte Vermehrung und wucherndes Wachstum einer einzigen Zelle zu einer bösartigen (maligne) oder gutartigen (benigne) Neubildung (Neoplasie), auch Tumor genannt, führt. Bei der malignen Form des Tumors (Krebs) dringen die entarteten Zellen in umliegende gesunde Gewebe und Organe ein und zerstören diese durch weiteres invasives Wachstum, auch bekannt als Metastasenbildung [1, 2]. Eine Verbreitung in entferntere Bereiche des Körpers findet dabei über Blut- und Lymphbahnen statt. Zudem kann der Krebs, auch nach einer Entfernung des Tumors oder Heilung, immer wieder neu entstehen (Rezidiv). Krebszellen sind im Gegensatz zu normalen Zellen weniger spezialisiert und differenziert, weisen mehr genetische Veränderungen auf, sogenannte Mutationen, und können dem Immunsystem ausweichen [3]. Neben äußeren Einflüssen, wie Ernährung, Strahlung, Rauchen, Alkohol, bakterielle und virale Infektionen [4, 5] kann eine genetische Veranlagung ebenfalls bei der Entstehung von Tumoren eine wichtige Rolle spielen [6], [7]. Es gibt mehr als 100 Arten und Unterarten von Krebs, welche darin unterschieden werden vom welchem Zelltyp sie abstammen. So haben zum Beispiel Karzinome ihren Ursprung in Epithelzellen [3, 8].

1.1.2 Karzinogenese

Die Karzinogenese oder Tumorgenese beschreibt den mehrstufigen Prozess (Initiation, Promotion, Transformation und Tumorprogression) der Entstehung einer malignen Neoplasie. Hierbei kommt es fortlaufend zu vielfachen Veränderungen auf zytogenetischer, genetischer und epigenetischer Ebene durch die Aktivierung von Proto-Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Stabilitätsgenen [7, 9], [10]. Dadurch wird das genetisch geregelte Gleichgewicht zwischen Proliferation und Zelltod (Apoptose) gestört, wodurch es zur unkontrollierten Teilung von Zellen und somit zur Bildung von malignen Tumoren kommt [8]. Der Grund für die Entstehung von Krebs kann, wie bereits erwähnt, sehr verschieden sein. Selten reicht bereits eine einzelne Mutation zur Bildung eines Tumors aus [8]. Im weiteren Verlauf können drei bis zwölf oder mehr physiologisch relevante Mutationsereignisse auftreten [11, 12]. Genetische Veränderungen, die nicht in Keimzellen vorkommen, nennt man somatische Mutationen

[3], deren Anhäufung innerhalb einer Zelle als somatische Evolution bezeichnet wird [12]. Auch zwischen den einzelnen Krebszellen kann eine starke Heterogenität von Mutationen vorliegen, was schließlich zu einer genomischen Vielfalt führt [12]. Auf zellulärer Ebene stellen solche Mutationen der Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene für den Tumor einen Vorteil bezüglich der Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren, Aktivierung der Invasion und Metastasierung, unendliches Replikationsvermögen, Aufrechterhaltung der Angiogenese, Umgehen der Apoptose, Umprogrammieren des Metabolismus und Ausweichen des Immunsystems dar [1].

1.1.3 Proto-Onkogene, Tumorsuppressorgene und Stabilitätsgene

Bei der Entstehung von Krebs sind drei verschiedene Typen von Genen verantwortlich. Als erstes sind die Proto-Onkogene zu nennen, die für Proteine kodieren, die das Zellwachstum, die Zellteilung, die Zelldifferenzierung oder die Apoptose kontrollieren. So rufen zum Beispiel chromosomale Translokationen oder kleine Mutationen (Punktmutationen) regulatorisch wichtiger Aminosäurereste eine Aktivierung von Proto-Onkogenen hervor. Das führt zur Überexpression beziehungsweise zu einer andauernd oder konstitutiv aktiven Form des Gens, welches dann als Onkogen bezeichnet wird [7]. Aber auch das Fehlen von miRNAs (*microRNAs*), die die mRNA vieler Proto-Onkogene binden (tumorsuppressive miRNAs), kann zu deren Überexpression führen [13]. Die Proto-Onkogene können entsprechend ihrer Funktion in sechs Gruppen eingeteilt werden: (I) Umstrukturierungsproteine von Chromatin, (II) Transkriptionsfaktoren, (III) Wachstumsfaktoren, (IV) Rezeptoren von Wachstumsfaktoren, (V) Signalvermittler und (VI) Apoptoseregulatoren [14]. Stabilitätsgene und Tumorsuppressorgene hingegen kodieren für Proteine, die jeweils die Entstehung oder Entwicklung von Tumoren verhindern sollen. So kodieren Stabilitätsgene für verschiedene DNA-Reparaturproteine, die eine genetische Instabilität auf ein Minimum reduzieren. In Folge von Mutationen dieser Gene kommt es zu einer Zunahme der Mutationsrate anderer Gene. Tumorsuppressorgene oder auch Anti-Onkogene genannt, sind Gene die für die Blockierung des Wachstums und der Vermehrung von Zellen verantwortlich sind. Kommt es zur Mutation eines solchen Gens, ist deren Aktivität eingeschränkt oder gänzlich blockiert. Dies kann unter anderem durch epigenetische Stilllegung des Gens sowie Insertionen oder Deletionen von Genabschnitten in variabler Größe hervorgerufen werden, was wiederum den Verlust von regulatorisch essentiellen Aminosäuren oder gar der Bildung verkürzter Proteine zur Folge haben kann [7]. Alternativ kann auch eine Überexpression von miRNAs, die Tumorsuppressorgene reprimieren (onkogene

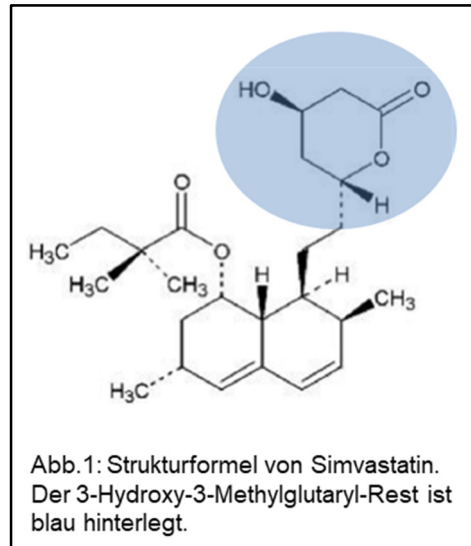
miRNAs), zur Blockierung dieser führen. Die Ursache einer Dysregulation von miRNAs kann ebenfalls durch Deletionen oder Mutationen, welche die Prozessierung von miRNAs oder die Amplifizierung von miRNA Loci beeinflussen, entstehen [13].

1.1.4 Behandlung von Krebs

Trotz großer Fortschritte stellt Krebs in den industrialisierten Ländern heute noch die zweithäufigste Todesursache dar [5]. Auf Grund der hohen Vielfalt an Krebsarten und Unterarten sowie einer starken Heterogenität innerhalb des Tumorgewebes sind die Behandlungsmethoden sehr vielseitig. Daher besteht auch weiterhin ein großes Interesse an der Krebsforschung und neuen Möglichkeiten diesen erfolgreich zu behandeln, da einige maligne Tumore nicht ausreichend auf konventionelle Methoden wie Bestrahlung, Chemotherapie oder einen chirurgischen Eingriff [15] ansprechen oder Resistenzen ausbilden wie im Fall der Chemotherapie [16]. Zudem sind diese Therapieansätze mit vielen Nebenwirkungen und hoher Toxizität verbunden. Deshalb bietet die personalisierte Krebstherapie einen effektiven und zielgerichteten Ansatz zur Bekämpfung maligner Tumore [15]. Hierfür kommen zum Beispiel monoklonale Antikörper, Thyrosin-Kinaseinhibitoren [17], Peptidmimetika, siRNA (*small interfering RNA*) und Antisense-Oligonukleotide zum Einsatz [15, 18]. Ein anderer Ansatz stellt die Krebs-spezifische Immuntherapie dar, wobei Therapeutika wie Tumorantigen-Impfstoffe sowie Hilfsmittel, die die angeborene Immunantwort und Zellzyklus-Checkpoint-Blockade aktivieren, Anwendung finden [19]. Zudem ist bekannt, dass onkogene und tumorsuppressive miRNAs ebenfalls bei der Krebsentstehung involviert sind. Diese werden nicht nur als Biomarker zur Diagnostik des Tumors verwendet, sondern können auch mit Hilfe der miRNA-basierten Therapie zur Bekämpfung von Krebs eingesetzt werden [20]. Eine weitere Möglichkeit stellt das bereits im Handel verfügbare Statin dar. Hierzu wurden einige Kohorten-Studien, Fall-Kontroll-Studien, Metaanalysen und klinische Studien durchgeführt, die Statine als Einzelgabe oder in Kombination mit anderen Medikamenten zur Krebsvorbeugung und Behandlung vorschlagen [21-23].

1.2 Statine

Statine sind kompetitive Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A Reduktase (HMG-CoA Reduktase), welche alle die HMG Grundstruktur gemeinsam haben und dadurch sowohl dem HMG-CoA als auch dem Mevalonat ähneln [21, 24]. Die Unterschiede liegen in ihrer Herkunft. So können sie entweder natürlichen Ursprungs sein oder werden synthetisch hergestellt. Die natürliche Form wurde aus Pilzen, wie zum Beispiel *Aspergillus terreus*, *Monascus ruber* (Lovastatin) [25, 26] oder *Penicillium citrinum* (Mevastatin) [27] isoliert, welche Statine als sekundäre Metabolite bilden. Im Allgemeinen sind sie aus Laktone und β -Hydroxysäuren mit



mehreren verschiedenen Seitengruppen aufgebaut, welche somit ein Hydroxy-Hexahydro-Naphtalen-Ringsystem formen. Simvastatin und Lovastatin liegen im Gegensatz zu allen anderen Statinen als inaktive Form (Prodrug) vor und müssen in der Leber in ihre aktiven Metabolite, durch Hydrolyse der Laktone zu β -Hydroxysäuren, umgewandelt werden. Aus diesem Grund stellen sie sogenannte Prodrugs dar [21]. Simvastatin ist ein halbsynthetisches Derivat des Lovastatins [28]. Die synthetischen Statine, wie Atorvastatin und Fluvastatin, setzen sich aus β -Hydroxysäuren und Fluorophenylgruppen zusammen und sind untereinander stark verschieden. Desweiteren besitzen Statine als kompetitive Inhibitoren eine höhere Affinität zur HMG-CoA Reduktase als das natürliche Substrat HMG-CoA [29]. Im Allgemeinen weisen sich Statine durch die verschiedenen hydrophilen und lipophilen Eigenschaften aus, die die Fähigkeit der Aufnahme über die Membran und damit die Bioverfügbarkeit des Medikamentes in den verschiedenen Geweben beeinflussen. So können lipophile Statine wie Lovastatin und Simvastatin direkt die Membranen der Leberzellen und Zellen anderer Gewebe passieren und werden über das CYP-System (Cytochrom-P450-System), insbesondere über CYP3A4, verstoffwechselt [30]. Das hydrophile Pravastatin benötigt dagegen hierfür den OATP1B1 Membrantransporter, welcher ausschließlich in der Leber vorkommt, weshalb es dort akkumuliert. Die Metabolisierung dieses Statins findet zudem nicht oder nur unwesentlich über das CYP-System statt [21, 30, 31].

1.2.1 Der Einfluss von Statinen auf den Mevalonatweg

Statine sind verantwortlich für die Hemmung des Schlüsselenzyms des Mevalonatweges [24]. Auf Grund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu dem Ausgangsstoff HMG-CoA, stellen sie ein natürliches Substrat der HMG-CoA Reduktase dar [21]. Die Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonat ist ein essentieller und zugleich limitierender Schritt dieses Biosyntheseweges. Hierbei wird der Ausgangsstoff (Dimethylallylpyrophosphat) für den daran anschließenden Cholesterin-Biosyntheseweg gebildet, woraus wiederum verschiedene, wichtige Endprodukte hervorgehen, die für viele zelluläre Funktionen benötigt werden. Neben der Bildung von Cholesterin, einer wichtigen Komponente der Zellmembran, kommt es zur Synthese weiterer Isoprenoide wie Farnesylpyrophosphat (FPP), Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), Dolichol, Ubiquinon, Steroide und Isopentyladenin. Somit erfolgt durch die Wirkung von Statinen eine Inhibition dieser Endprodukte [29].

1.2.2 Der Einfluss von Statinen auf endogene Cholesterinbiosynthese und den Cholesterinspiegel im Blut

Durch den Einsatz von Statinen kommt es zur Senkung der Cholesterinproduktion in der Leber, wodurch es zur Zunahme der LDL (*low density lipoprotein*)-Rezeptoren auf deren Zelloberfläche kommt. Dadurch erfolgt die Aufnahme von LDL-Partikeln aus dem Blut in die Leber und deren Abbau in der Zelle. Lipoproteine transportieren Cholesterin und andere Lipide über das Blut von der Leber zu den Geweben (LDL-Partikel) oder umgekehrt (HDL-Partikel) [32]. Folglich sinken die Mengen der Triglyceride [29] und des LDL-Cholesterins im Blut. Als Gegenmaßnahme kommt es in den Leberzellen zur posttranskriptionellen Aktivierung der Transkriptionsfaktoren SREBP-1 und -2 (*sterol response element binding protein-1/-2*), welche die Expression der HMG-CoA Reduktase regulieren [33, 34]. Dadurch steigen zwar die HMG-CoA Reduktase Spiegel erneut an, allerdings hat dies, auf Grund der effektiven Enzym-Hemmung durch die Statine, keine Auswirkungen auf die Cholesterin-Biosynthese [29]. Zudem erfolgt eine verringerte Expression Lipidstoffwechsel-relevanter Gene, wie z.B. *Abca1*, bedingt durch eine Erhöhung der miR-33a/b Spiegel, die im Intron 16 des *Srebp-2* Gens beziehungsweise im Intron 17 des *Srebp-1* Gens lokalisiert sind und jeweils zusammen co-transkribiert werden [35]. Dies hat schließlich zur Folge, dass das Level des „guten“, lipidarmen HDL-Cholesterins (*high density lipoprotein*) im Blutplasma leicht ansteigt [35, 36]. Da Statine eine Abnahme des „schlechten“ LDL-Cholesterins im Blutplasma bewirken, sind sie das am häufigsten eingesetzte Medikament gegen Hypercholesterin-

ämie [23], eine Erkrankung die sich durch einen erhöhten Cholesterinspiegel im Blut auszeichnet und langfristig Arteriosklerose und somit kardiovaskuläre Erkrankungen zur Folge haben kann [29].

1.2.3 Der Einfluss von Statinen auf Krebszellen

Neben der Hemmung der endogenen Cholesterin-Biosynthese und der damit verbundenen Minimierung kardiovaskulärer Erkrankungen, haben Statine noch weitere positive Wirkungen auf den Organismus, sogenannte pleiotrope Effekte. Hierzu gehören unter anderem entzündungshemmende und neuroprotektive Wirkungen, die Verbesserung endothelialer Funktionen sowie einige Anti-Tumor-Effekte. Diese ergeben sich aus der Blockierung des Mevalonatweges, der Stoffwechselprodukte liefert, die für viele physiologische Prozesse wichtig sind. Dazu gehören zelluläre Signalkaskaden, Veränderung der Translation und posttranslationelle Modifikationen, die die mit dem Zellzyklus einhergehende Zellteilung, Apoptose, Zelldifferenzierung und die zelluläre Antwort auf oxidativen Stress regulieren [22, 23]. Diese Anti-Tumor-Effekte treten allerdings nur beim Einsatz lipophiler Statine auf [23]. Die Isoprenoid-Zwischenstufen Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und Farnesylpyrophosphat (FPP) können die Proteinfunktion von Ras, Rac und Rho, regulieren, indem sie langkettige Kohlenstoffwasserstoffreste kovalent an diese GTPasen binden (Prenylierung). Dadurch kommt es zur Beeinflussung von Protein-Protein und Protein-Membran Interaktionen, sowie die Translokation von Proteinen aus dem Cytosol an die Membran, wodurch viele essentielle zelluläre Prozesse (u.a. Proliferation, Apoptose, Zellmigration) beeinflusst werden, da GTPasen durch alternierende Bindung der Nukleotide GDP und GTP eine Schlüsselfunktion als molekulare Schalter in der Signaltransduktion übernehmen [37]. Darüber hinaus sind Veränderungen des Zellmetabolismus, wie die Unterdrückung der Glykolyse, des Citratzyklus und des Lipid-Stoffwechsels die Folge [21, 23]. Obwohl seit den frühen 90er Jahren die Anti-Tumor-Effekte von Statinen erforscht werden, sind die damit assoziierten, exakten molekularen Mechanismen noch weitgehend unbekannt [21]. Jedoch haben bereits diverse *in vitro* und *in vivo* Studien einige neue Erkenntnisse diesbezüglich hervorgebracht, worauf in den nachfolgenden Abschnitten noch näher eingegangen wird [21-23].

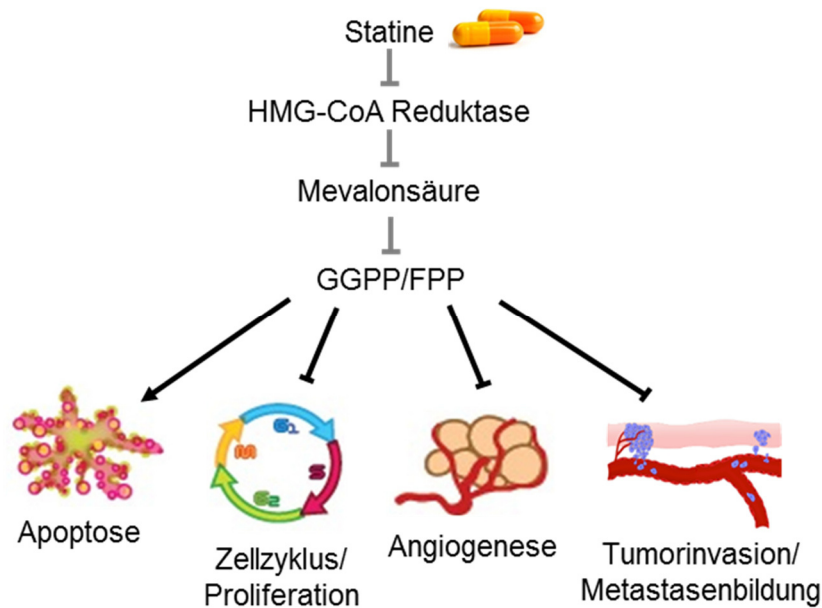


Abb.2: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Statinen auf Krebszellen. Aus der Statinbedingten Hemmung der HMG-CoA Reduktase folgt die Abnahme der Mevalonsäure- und Isoprenoid-Synthese. Dadurch wird die Apoptose in Tumorzellen gefördert und deren Proliferation, Angiogenese und Metastasenbildung inhibiert. Der direkte Einfluss ist mit grauen Pfeilen dargestellt. Die indirekten (pleiotropen) Effekte sind mittels schwarzer Pfeile abgebildet.

1.2.4 Hemmung der Proliferation durch Statine

Statine sind in Lage das Wachstum von Krebszellen zu inhibieren, indem sie die Expression und Aktivität vieler Zellzyklus-relevanter Proteine modulieren. So kommt es unter Lovastatin-Gabe zum einen zur Hochregulation der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21 und p27 und zum anderen zur Unterdrückung Zellzyklus-fördernder Faktoren wie Cyclin D1, Cyclin-abhängigen Kinase 4 (CDK4) und dem Retinoblastom-Protein (pRb). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Bildung von GGPP und somit die Membranverankerung von RhoA unterbunden ist und p21 nicht länger durch diese prenylierte GTPase inhibiert wird [38]. Dadurch verbleiben die Tumorzellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Die Statin-vermittelte Akkumulation der CDKs wird weiterhin durch die Hemmung des Proteasoms oder der Histon-Deacetylase Aktivität reguliert [21, 23]. Zudem kann es durch Simvastatin-Behandlung zur Anreicherung der Krebszellen in der S-Phase des Zellzyklus kommen, was mit einer verminderten Aktivität der CDC25 Phosphatase (*cell division cycle 25 phosphatase*) sowie einer Reduktion der Cyclin A und CDK2 Level verbunden ist [21]. Eine Inhibition der Ras GTPase verbunden mit der Hemmung des MAP (*mitogen-activated protein*) Kinase-Signalweges, der PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)/AKT-Signalkaskade oder der mTOR (*mechanistic target*

of rapamycin)/AKT-Signaltransduktion durch Statine kann ebenfalls zu den eben beschriebenen anti-proliferativen Effekten führen [39, 40].

1.2.5 Förderung der Apoptose durch Statine

Kato und Kollegen konnten 2010 zeigen, dass von lipophilen Statinen eine höhere Apoptose-fördernde Aktivität ausgeht als von hydrophilen Statinen [41]. Diese können den Zelltod über den intrinsischen und extrinsischen Signalweg einleiten, hauptsächlich hervorgerufen durch die verminderte Prenylierung von Proteinen [22]. Bei dem intrinsischen, mitochondrialen Weg kommt es unter anderem zur Aktivierung der Caspase-Kaskaden 2, 3, 7, 8 und 9 sowie des Tumorsuppressors p53. Die Einleitung des Caspase-3 Signalweges erfolgt durch die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und der verringerten Expression des anti-apoptischen Proteins BCL-2 sowie der erhöhten Expression des pro-apoptischen Proteins BAX, sowohl auf der Transkriptions- als auch auf Proteinebene. Weitere charakteristische Merkmale für Statin-induzierte Caspase-Wege sind die Fragmentierung von DNA, die Spaltung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) und die Verminderung des Apoptose-hemmenden Proteins Survivin [21, 23]. Statine können zudem mit Hilfe weiterer Signalwege wie dem Superoxid-aktivierenden C-Jun-N-terminalen Kinase-Weg (JNK), dem MEK/ERK Weg und die AKT Signalkaskade, einschließlich dessen Folgesubstrate, den Zelltod einleiten [23]. Eines dieser Folgeproteine des AKT Signalweges ist die *survival* Kinase PIM1, auf die in späteren Abschnitten noch genauer eingegangen wird [42]. Der Statin-vermittelte extrinsische Apoptose-Signalweg wird ausgelöst durch die Zunahme des FAS-FADD-Komplexes, welcher wiederum die Caspase-Kaskade 8 aktiviert [21].

1.2.6 Hemmung der Angiogenese durch Statine

Die Angiogenese beschreibt den Prozess der Gefäßneubildung (Neovaskularisation), der für das Wachstum und die Ausbreitung von primären Tumorzellen sowie der Metastasenbildung von sehr großer Bedeutung ist. Statine können diesen Prozess eindämmen, abhängig von deren Dosis und des Tumorzelltyps. Hohe Statin-Konzentrationen führen zu einer verringerten GGPP-Prenylierung der GTPase RhoA, wodurch es zu einer reduzierten Ausschüttung des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) aus Endothelzellen und dessen Folgesubstrate kommt [22, 23]. Dieser Faktor stellt eines der wichtigsten Signalmoleküle der Angiogenese dar, da er durch die

Freisetzung weitere vaskuläre Endothelzellen stimuliert und somit eine Gefäßneubildung herbeiführt [43].

1.2.7 Hemmung der Tumorinvasion und Metastasenbildung durch Statine

Statine können die invasiven und metastatischen Eigenschaften von Krebszellen beeinflussen, indem sie die Zellwanderung inhibieren und die Aufhebung der Zellkontakte mit der extrazellulären Matrix sowie das Durchdringen der Basalmembran verhindern. Wie schon bei der Angiogenese zeigen Statine auch bei der Tumorinvasion eine konzentrationsabhängige Hemmwirkung. Zudem konnte gezeigt werden, dass lipophile Statine, wie Simvastatin, ein höheres Potential zur Verringerung der Tumorausbreitung im Körper aufweisen als hydrophile Statine [22, 29]. Diese anti-tumorgene Wirkung von Statinen erfolgt ebenfalls über die Blockierung der GGPP-Synthese und der damit verbundenen EGF-induzierten (Epidermaler Wachstumsfaktor) Translokation des RhoA in die Zellmembran. Rho GTPasen sind Signalmoleküle, die durch die Kontrolle der Zellwanderung die Metastasenbildung beeinflussen können. Dieser Prozess wird über den RhoA/ fokale-Adhäsionskinase (FAK)/ AKT Signalweg reguliert und kann durch Statine gehemmt werden [23]. Die fehlende Prenylierung der GTPasen RhoA und RhoB führt zudem zur Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch die verminderte Aktivierung des Tumornekrosefaktors TNF α . Weiterhin kommt es zur Blockade der Expression des Zelladhäsionsmoleküls E-Selektin in den Endothelzellen und des CD44-Antigens. Somit ist das CD44-Rezeptormolekül nicht mehr in der Lage den EGF-Rezeptor-Signalweg zu verstärken und die Matrix-Metalloproteasen -2, -3 und 9 zu binden, was entsprechend eine Inhibierung der Zell-Matrix-Kontakte und eine verminderte Veränderung der Gewebestrukturen zur Folge hat [22, 23, 29].

1.3 Die PIM1 Kinase

1984 wurde PIM1 in einem T-Zell-Lymphom der Maus, induziert durch das Moloney Murine-Leukämievirus (Mo-MuLV), als Proto-Onkogen entdeckt. Durch die Integration dieses Virus in verschiedene Regionen des *Pim-1* Gens hat diese Kinase ihren Namen erhalten: *Proviral integration site for Moloney murine leukemia virus 1*. Der Einbau des Provirus, vornehmlich in die 3'-UTR (*untranslated region*) von *Pim-1* [44], ist assoziiert mit einer stark erhöhten Aktivierung der Transkription [45] beziehungsweise dem verminderten Abbau der *Pim-1* mRNA [46]. Im Allgemeinen gehören die PIM Kinasen PIM1, PIM2 und PIM3 [47] zu einer Familie konstitutiv aktiver Serin/Threonin Kinasen,

die in vielen Wirbeltieren hochkonserviert vorliegen [48]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein PIM1-Homolog auch in wirbellosen Tieren, wie dem Zehnfußkrebs, exprimiert wird [49]. Die PIM1 Kinase wird in verschiedenen Geweben gebildet und variiert hierbei in ihrer Expressionsrate. Vor allem im Knochenmark, im Thymus, in der Milz, im fetalen Lebergewebe und in nicht blutbildendem Gewebe wie Hippocampus, Herz, Prostata, Epithel,- Endothel- und Nervenzellen wird PIM1 besonders stark exprimiert [50-53]. Das menschliche *Pim-1* Gen ist auf dem Chromosom 6p21.1-p21.31 lokalisiert und umfasst ungefähr einen Bereich von 5 kb (Kilobasen) mit sechs Exons und fünf Introns. Das mRNA Transkript (NM_002648) besitzt eine Länge von 2648 bp (Basenpaaren), die für 313 Aminosäuren codieren, was einer Größe von 34 kDa (Kilodalton) entspricht [53, 54]. Allerdings wird neben dem 34 kDa Produkt noch ein weiteres Protein von 44 kDa infolge eines alternativen CUG Translationsstarts gebildet [55]. Die kürzere Isoform ist im Zellkern und im Zytoplasma zu finden, wohingegen die 44 kDa Form auf Grund des N-terminalen Prolin-reichen Motives hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert ist [56]. PIM1 besitzt eine typische „two-lobe“ Proteinkinase Struktur, die durch ein Gelenkstück, die sogenannte „hinge“ Region, verbunden ist. In dieser Kinasedomäne befindet sich die katalytische ATP-Bindestelle [57]. PIM1 besitzt im Gegensatz zu vielen anderen Kinasen keine regulatorische Domäne und damit kein Phosphorylierungsmotiv zur Aktivierung, weshalb es stets konstitutiv aktiv vorliegt [48]. Allerdings verfügt PIM1 über die Eigenschaft der Autophosphorylierung an den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin. Die Phosphorylierung des Serins 190 führt zur Aktivierung von PIM1, weshalb es das Hauptmotiv zur Autophosphorylierung darstellt [58]. Darüber hinaus wird die Expression von PIM1, abhängig vom Zelltyp, durch viele verschiedene Signalmoleküle induziert [59]. Im Allgemeinen unterliegt die Expression von PIM1 einer strengen Kontrolle auf den Regulationsebenen der Transkription, Posttranskription, Translation und Posttranslation [54].

1.3.1 Regulation von *Pim-1* auf transkriptioneller Ebene

Pim-1 besitzt einen sehr G/C-reichen Promotor ohne die klassischen Regulationselemente TATA-Box und CAAT-Box, welche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren darstellen [60]. Damit weist der *Pim-1* Promotor typische Merkmale eines Promotors von Haushaltsgenen auf [54]. Jedoch sind andere Bindestellen für Transkriptionsfaktoren vorhanden [60]. *Pim-1* gehört zu den sogenannten „primary response genes“, dessen Transkription durch Hormone [61] und Cytokine wie Interleukine, Interferone und Kolonie-stimulierende Faktoren schnell induziert wird [62]. Diese binden an Rezeptoren auf der Zelloberfläche und lösen damit den JAK/STAT-Signalweg (Januskinase/ signal

transducers and activators of transcription) aus. Hierbei kommt es zur Phosphorylierung von STAT3 oder STAT5, die als Transkriptionsfaktor an die ISFR/GAS-Sequenz (*gamma interferon activation sequence*) des *Pim-1* Promotors binden und die Transkription bewirken. Allerdings kann PIM1 über die Aktivierung beziehungsweise Phosphorylierung von SOCS-Proteinen (*suppressor of cytokine signalling*) die JAK/STAT-Signaltransduktion wieder herunterregulieren. Darüber hinaus wird die Expression von *Pim-1* durch die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (*nuclear factor kappa-B*), HIF1 α (*hypoxia-inducible factor 1 α*) und KLF5 (*Krüppel-like factor 5*), jeweils ausgelöst durch die Rezeptorbindung von TNF α , Sauerstoffmangel und DNA-Schäden, induziert [62, 63].

1.3.2 Regulation von *Pim-1* auf posttranskriptioneller Ebene

Die mRNA von *Pim-1* besitzt eine kurze Halbwertszeit. Die 3'-UTR ist mit einer Länge von circa 1400 bp sehr groß [59] und hat einen G/C-Gehalt von 69 % [64]. Die Kurzlebigkeit der mRNA beruht darauf, dass sich in der 3'-UTR mehrere A/U-reiche Elemente (ARE) befinden [59], an denen ARE-Bindeproteine binden und damit eine Destabilisierung der mRNA bewirken [65]. Ein solches Beispiel ist das ARE-Bindeproteine Tristetraprolin (TTP), welches den mRNA Abbau von *Pim-1* im Exosom oder in den P-bodies (*processing bodies*) zur Folge hat [66, 67]. Dieser ARE-vermittelte Abbauweg geht einher mit der Deadenylierung des 3'-Endes und der Entfernung der 7-Methylguanosin-Nukleotid Kappe des 5'-Endes der mRNA [68]. Insulin, Phorbolster sowie Serum und andere Mitogene können diesen Prozess stimulieren [66]. Im Gegensatz dazu kann bei Sauerstoffmangel eine Stabilisierung der *Pim-1* mRNA mit Hilfe des ARE-Bindeproteins HuR (Hu Antigen R) erfolgen [69]. Eine weitere Möglichkeit der posttranskriptionellen Regulation ist die Bindung verschiedener microRNAs (miRNAs) in der 3'-UTR. So führen zum Beispiel miR-1 [70] oder miR-33a [71] ebenfalls zur Destabilisierung der *Pim-1* mRNA und folglich zu dessen Abbau.

1.3.3 Regulation von *Pim-1* auf translationeller Ebene

Ebenso wie die 3'-UTR zeichnet sich die 5'-UTR durch einen hohen G/C-Gehalt von 75 % aus. Dadurch bildet die circa 400 Nukleotid lange 5'-UTR Sekundärstrukturen aus, die die Translationseffizienz von *Pim-1* verringern [64, 72]. Aus diesem Grund wird die *Pim-1* mRNA als „schwaches“ Transkript angesehen [62], ein Merkmal, dass für viele Wachstumsfaktoren und Proto-Onkogene bekannt ist [54]. Diese mRNAs unterliegen einer sogenannten *cap*-abhängigen Translation [59]. Widersprüchlich hierzu war jedoch

die langjährige Annahme, dass *Pim-1*, auf Grund der langen 5'-UTR einer IRES (*internal ribosomal entry site*)-abhängigen Translation unterliegen würde, so wie es bei zahlreichen anderen Proto-Onkogenen der Fall ist. Hierfür lieferten Wang und Kollegen 2005 eine mögliche Erklärung. Sie begründeten die gewebe- und entwicklungs-spezifische Regulation der *Pim-1* Expression mit dem Vorhandensein eines kryptischen Promotors innerhalb der 5'-UTR [73]. Ein weiterer Hinweis, dass es sich bei *Pim-1* um ein schwaches Transkript handelt, ist die nicht optimale Sequenzabfolge *upstream* und *downstream* des Translation-Startcodons AUG [64]. Diese Kozak-Sequenz stellt die optimale ribosomale Bindestelle dar und vermittelt die Initiation der Translation [74, 75]. Zudem kommen 7 CAG Tandem-Wiederholungssequenzen in dem hoch strukturierten Bereich der 5'-UTR vor, die die *cap*-abhängige Translationseffizienz der *Pim-1* mRNA ebenfalls negativ beeinflussen können [64]. Eine weitere wichtige Komponente der *cap*-abhängigen Translation sind die Translations-Initiationsfaktoren (eIFs). Vor allem eIF4E (*eucaryotic translation initiation factor 4E*) ist von besonderer Bedeutung. Zum einen ist er zusammen mit eIF4G an der Bildung des eIF4F-Initiationskomplexes unter Bindung der 5'-Kappe der mRNA beteiligt. Dieser Komplex rekrutiert wiederum die Ribosomen an die mRNA und löst die Translation aus. Zum anderen bewirkt er die Translokation der mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma durch die Bindung der *stem-loop-pair* Sequenz in der 3'-UTR [59]. Dadurch ist eIF4E generell ein limitierender Faktor der Translations-Initiation, dessen Expression die Proteinsynthese von PIM1 erhöht [72].

1.3.4 Regulation von PIM1 auf posttranslationeller Ebene

Da PIM1 eine konstitutiv aktive Kinase ohne regulatorische Domäne darstellt, benötigt diese keine posttranslationellen Modifikationen zur Aktivierung des Proteins [76]. Allerdings konnten Kim und Kollegen 2004 zeigen, dass die Phosphorylierung des konservierten Tyrosinrestes 218 im Aktivierungsloop von PIM1, durch die Kinase ETK, möglicherweise zu dessen Aktivierung führt [77]. Generell ist PIM1 ein sehr kurzlebiges Protein mit einer Halbwertszeit von etwa 10 Minuten für die 34 kDa Isoform und circa 1 Stunde für das 44 kDa Protein [55]. Dieser schnelle Abbau wird eingeleitet durch die Ubiquitylierung [46] oder Sumoylierung [76] des Proteins und führt damit zu dessen Degradation im 26S-Proteasom. Bei der Sumoylierung handelt es sich um eine kovalente, reversible Bindung einer SUMO (*small ubiquitin-like modifier*)-Proteinmarkierung an ein Zielprotein, was schließlich eine Übertragung weiterer Ubiquitin-Reste auf bestimmte Aminosäuren des Proteins hervorruft. Allerdings kann die Sumoylierung von PIM1 nicht nur mit dessen Abbau sondern möglicherweise auch mit einer Veränderung der Kinaseaktivität einhergehen [76]. Zudem können die beiden

Hitzeschock-Proteine (*heat shock proteins*) HSP90 und HSP70 verschiedene Adapterproteine binden und somit die Stabilität von PIM1 beeinflussen. Eine Bindung des HSP90 an PIM1 führt zu dessen Stabilität [78], wohingegen eine Ubiquitin vermittelte Interaktion von HSP70 und PIM1 mit Hilfe von Adapterproteinen, fungierend als E3 Ubiquitinligase, weitere Ubiquitinylierungen und dadurch den Abbau von PIM1 zur Folge haben [46]. Das Chaperon-Protein HSP90 dient vermutlich ebenfalls sowohl als molekularer Schalter zur Aufrechterhaltung der aktiven Konformation von PIM1 als auch dem Schutz vor der Protein Phosphatase 2A (PP2A) [78]. Durch die Bindung der Prolyl-Isomerase PIN1 an PIM1 ist PP2A in der Lage PIM1 zu desphosphorylieren, wodurch die Ubiquitinylierung und damit der proteasomale Abbau von PIM1 eingeleitet wird [79]. Obwohl das Proteasom den Hauptabbauweg kurzlebiger Proteine darstellt, schließen Shay und Kollegen dennoch nicht aus, dass PIM1 unter bestimmten Bedingungen ebenso im Lysosom degradiert werden kann [46]. Dieses ist vorrangig am Abbau falsch gefalteter Proteine [80], langlebiger Proteine und zerstörter Organellen beteiligt [81]. Dabei kann HSP70 in Kooperation mit CHIP (*carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein*) über den proteasomalen oder lysosomalen Abbau von Proteinen entscheiden [82].

1.3.5 Das Potential von PIM1 als Zielmolekül in der Krebstherapie

Die PIM1 Kinase ist in verschiedenen Signalwegen involviert, die die Blutbildung sowie die Entstehung und Reifung von Lymphozyten beeinflussen [53]. Zudem ist Pim1 in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert oder mutiert, wodurch es zu einer genetischen Instabilität kommt [53], die bei verschiedenen Formen der Leukämie, Lymphomen und soliden Tumoren, wie Leberkarzinom [83] und Dickdarmkarzinom [84] sowie in einigen Fällen des Prostatakrebs mit einer schlechten Tumorprognose und Therapieverlauf korreliert [57]. In Kopf-Hals-Tumoren geht eine erhöhte Expression von PIM1 ebenfalls mit einer verringerten Wirksamkeit der Strahlentherapie und einem verstärkten Potential zur Bildung von Metastasen einher [57], denn es stellt einen wichtigen *downstream* Effektor der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-vermittelten Angiogenese und der damit verbundenen Neovaskularisation dar [52]. PIM1 ist eine *prosurvival* Kinase dessen Substrate viele essentielle physiologische Prozesse wie den Zellzyklus und das Zellwachstum, die Differenzierung und Migration von Zellen, sowie die Apoptose regulieren [54, 57, 62]. Des Weiteren kann PIM1 die Wirkung von Chemotherapeutika auf Krebszellen herabsetzen indem es die Zellen vor der Apoptose schützt und diese zum Efflux der Medikamente verhilft [85]. Darüber hinaus beeinflusst PIM1 die Resistenz von Tumoren auf die Chemotherapie mittels Modulation der zellulären Antwort bei

Sauerstoffmangel [57]. Trotzdem ist PIM1 eher ein schwaches Onkogen [86], welches durch seine Überexpression allein nicht gutartige in bösartige Tumore transformieren kann. Dennoch erhöht es gewebesabhängig die tumorigenen Eigenschaften bedingt durch die mittels Phosphorylierung aktivierten Substrate beziehungsweise Signalwege [62]. In Kooperation mit anderen Proto-Onkogenen, wie zum Beispiel c-MYC, kommt es durch den synergistischen Effekt beider Proteine zu einer dramatischen Tumorentwicklung [87].

Ein vorteilhaftes Merkmal von PIM1 ist jedoch, dass durch einen Knockout der Kinase in Mäusen, diese nur einen gering veränderten Phänotyp aufweisen [88]. Dadurch wird deutlich, dass PIM2 [89] und PIM3 in der Lage sind die Aktivität von PIM1 in großen Umfängen zu kompensieren [86]. Sogar Mäuse mit einem Knockout aller drei PIM Kinasen zeigen lediglich eine geringere Körpergröße, sind aber überlebensfähig, gesund und fruchtbar [47].

Diese Eigenschaften machen PIM1 zu einem aussichtsreichen Zielmolekül zur Behandlung von Krebs [86]. Vor allem durch die Interleukin gesteuerte Transkription besitzt PIM1 ein großes Potential für die Immuntherapie [85] und stellt einen gut geeigneten diagnostischen und prognostischen Biomarker dar [86].

1.3.6 Regulation der Apoptose durch PIM1

PIM1 als *prosurvival* Faktor besitzt die Fähigkeit viele pro- und anti-apoptischen Proteine hinsichtlich des Überlebens der Zelle zu steuern. Hierzu gehört unter anderem die Phosphorylierung des proapoptischen Proteins BAD am Serin 112, was zu dessen Inaktivierung und der gleichzeitigen Aktivitätserhöhung des anti-apoptischen Proteins BCL-2 führt [90]. Dies kann ebenfalls über die Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B geschehen, welcher die Expression von BCL-2 und BCL-XL reguliert [86]. Eine Abschwächung der Apoptose-Signal Kinase 1 (ASK1), vermittelt durch dessen Phosphorylierung, geht einher mit der verringerten Aktivität der JNK Kinase und der mitogenaktivierenden Proteinkinase p38 und der damit verbundenen Caspase-3 Aktivität [91]. Durch die Phosphorylierung von PRAS40 kommt es zur Dissoziation des Komplexes mit mTOR und somit zu dessen gesteigerter Aktivität, einem Protein das das Zellwachstums und den Zellzyklus hinsichtlich des Überlebens der Zelle beeinflusst [92]. Weiterhin ist PIM1 in der Lage das als E3 Ubiquitin-Ligase fungierende Protein MDM2 zu phosphorylieren, wodurch dieses stabilisiert wird und den Abbau des Tumorsuppressors p53 einleitet [93]. Zudem kann Pim1 über die Phosphorylierung von MDM2 oder die direkte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FOXO3a den Abbau von FOXO3a bewirken, was zu einer verringerten Induktion pro-apoptischer Proteine führt

[86]. Deshalb hat eine Stabilisierung von MDM2 ein zunehmendes Voranschreiten der Krebserkrankung, ein schlechtes Ansprechen auf Chemotherapeutika und damit insgesamt eine schlechte Prognose für den Krebspatienten zur Folge [86].

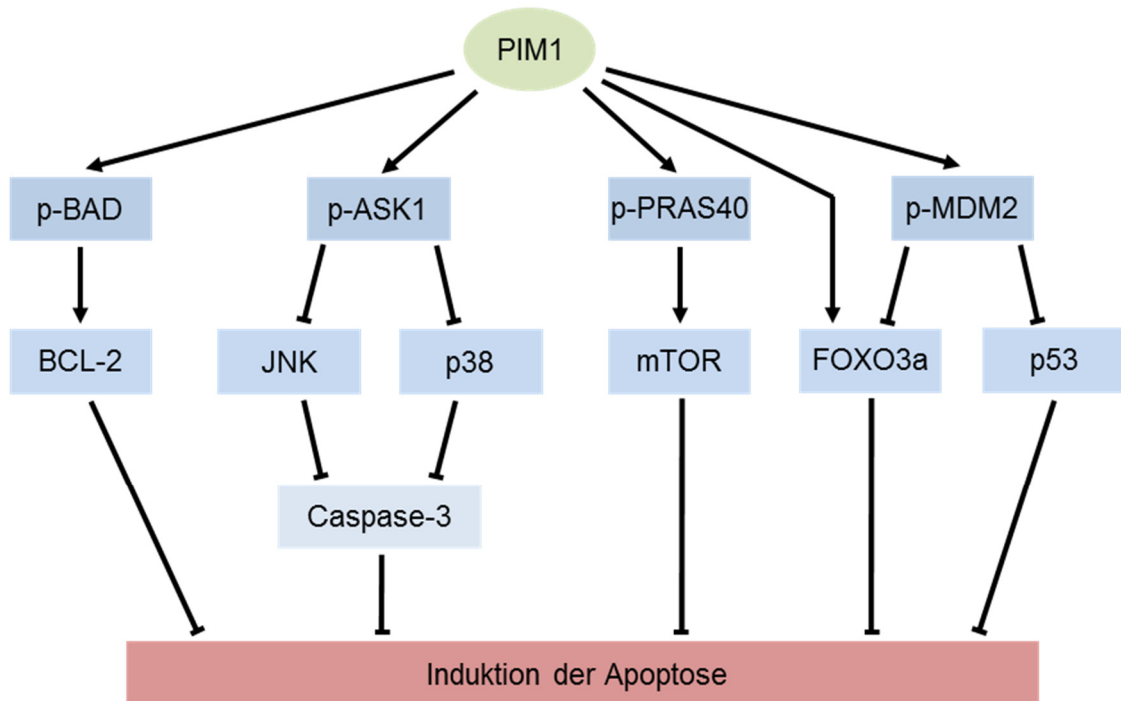


Abb.3: Schematischer Überblick der verschiedenen, durch PIM1 regulierten, Signalwege auf die Apoptose in Krebszellen. Die Abbildung wurde adaptiert nach Merkel et al., 2012 [57].

1.3.7 Regulation des Zellzyklus durch PIM1

PIM1 steuert die mit dem Zellzyklus einhergehende Zellteilung und das Zellwachstum in Krebserkrankungen durch die Phosphorylierung Zellzyklus-abhängiger Proteine und dem Eingreifen in die Mitose. Dies geschieht durch die Phosphorylierung der Zellzyklusinhibitoren $p21^{Cip1/waf1}$ (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1*) am Serin 146 und $p27^{kip1}$ (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*), welche dadurch inaktiviert und die Zellen aus der G1-Phase in die S-Phase geleitet werden [94, 95]. Allerdings ist PIM1 auch in der Lage die Transkription von $p27^{kip1}$ zu unterdrücken indem es die Forkhead-Box-Proteine FOXO1a und FOXO3a phosphoryliert und damit inaktiviert [95]. Darüber hinaus kann PIM1 die Bindung zwischen $p21^{Cip1/waf1}$ und PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) inhibieren, wodurch es zum Wiedereinsetzen der DNA Synthese und einer zunehmenden Ungenauigkeit der DNA Reparatur kommt [94, 96]. Eine weitere Möglichkeit für PIM1 in den Zellzyklus einzugreifen, findet sich in der Phosphorylierung der Zellzyklus Phosphatasen CDC25A und CDC25C, was dazu führt, dass deren

Aktivität erhöht wird und die Zellen den Übergang jeweils von der G1-Phase in die S-Phase beziehungsweise von der G2-Phase in die Mitose durchlaufen [97, 98]. Die Aktivierung von CDC25C durch PIM1 kann jedoch auch indirekt über die Phosphorylierung von c-TAK1 (CDC25C assoziierte Kinase1) erfolgen, denn c-TAK1 verfügt durch diese Modifikation nicht länger über die Fähigkeit CDC25C zu blockieren [99]. Zudem kann PIM1 auch eine genomische Instabilität hervorrufen. Hierfür interagiert die Kinase in der späten S-Phase und Metaphase mit den Spindelpolen. Darüber hinaus bewirkt die Phosphorylierung des Proteins NuMA (*nuclear mitotic apparatus*) eine Komplexbildung zusammen mit HP1 β (*heterochromatin-associated protein 1 β*), dem Motorprotein Dynein und dem Dynein-Aktivierungskomplex Dynactin [100], wodurch sich anormale mitotische Spindel und mehrfache Centrosomen ausbilden, die zur fehlerhaften Chromosomentrennung führen [101].

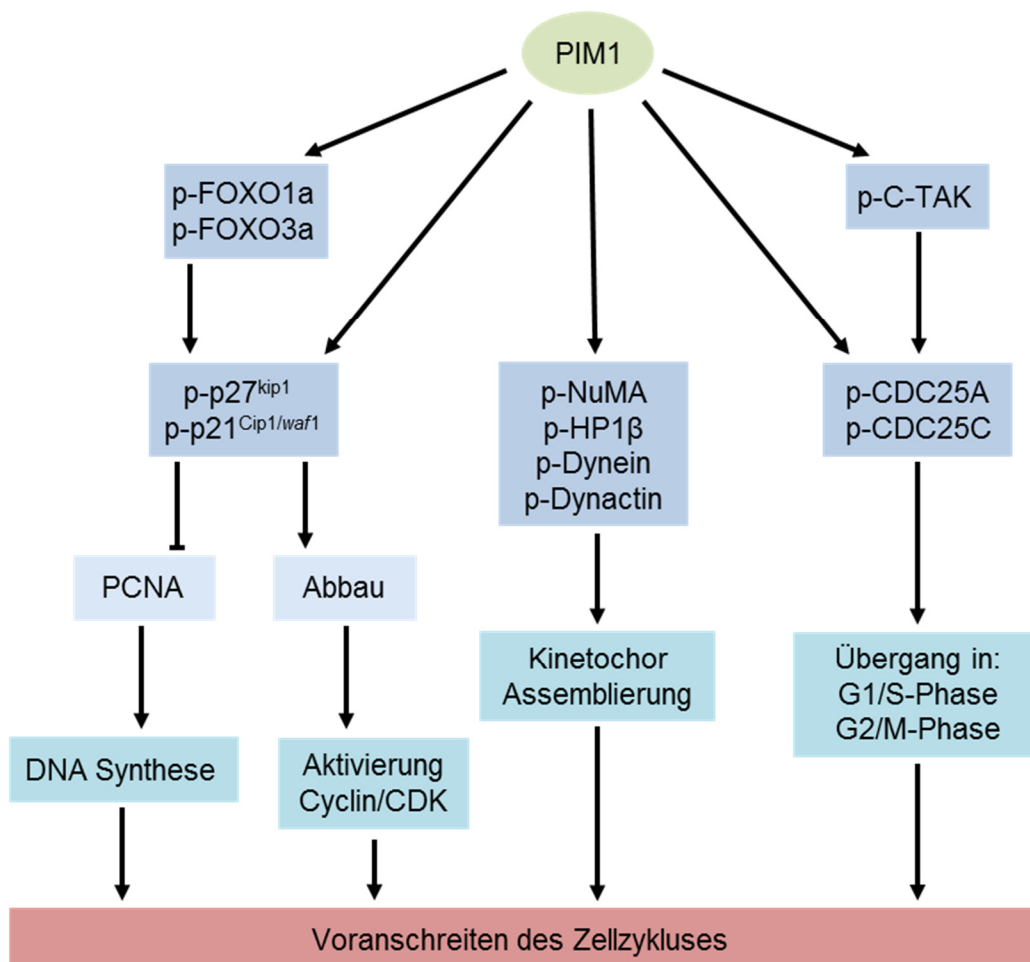


Abb.4 Schematischer Überblick der verschiedenen, durch PIM1 regulierten, Signalwege auf den Zellzyklus in Tumorzellen. Die Abbildung wurde adaptiert nach Merkel et al., 2012 [57].

1.4 Monozyten und Makrophagen

Makrophagen sind mononukleäre Zellen, die in fast allen Geweben des Körpers zu finden sind. Sie zirkulieren ungefähr 5 bis 7 Tage im Blut [102, 103] und wandern dann in die Gewebe ein, wo sie aus Monozyten zu Makrophagen differenzieren [104]. Makrophagen und Monozyten gehören neben den Granulozyten, Mastzellen und dendritischen Zellen zu den sogenannten Phagozyten des Immunsystems [104], die für die Aufnahme und Zersetzung von Mikroorganismen, Krankheitserregern und infizierten Zellen verantwortlich sind. Makrophagen können zudem tote Zellen und Zelltrümmer aufnehmen und dienen dem Transport von LDL-Cholesterin [105], weshalb sie auch als Fresszellen oder *scavenger cells* bezeichnet werden. Dadurch bilden sie die erste wichtige Abwehrlinie der angeborenen Immunität beziehungsweise aktivieren anschließend die erworbene Immunantwort durch Präsentation von Antigenen auf ihrer Oberfläche. Da die meisten Infektionen im Gewebe auftreten, können diese Phagozyten weitere Makrophagen in Folge von Entzündungen, durch Sezernierung entsprechender Signalproteine, zu den jeweiligen Geweben rekrutieren. Die Entstehung von Entzündungsreaktionen durch Aktivierung anderer Zellen des Immunsystems stellt allgemein die Voraussetzung für eine erfolgreiche Immunantwort dar [106]. Zudem dienen Makrophagen der Aufrechterhaltung einer gesunden Gewebemöostase und des Metabolismus sowie der Bildung neuer Blutgefäße [107]. Makrophagen sind relativ langlebige und heterogene Zellen, die schnell in der Lage sind ihre Funktion in Folge lokaler Signale des Mikromilieus zu verändern [104]. Diese Heterogenität ist auf Grund ihrer funktionellen Diversität und der damit einhergehenden Präsenz verschiedenster Oberflächenmarker und Rezeptoren sowie der vielfältigen Ausschüttung von Cytokinen zurückzuführen [106]. Die meisten der membrangebundenen Glykoproteine sind CD-Moleküle (*cluster of differentiation*), die verschiedene Rezeptor- oder Signalfunktionen ausüben. Hierzu gehören zum Beispiel das Phagozyten stimulierende MHC-Klasse-II-Molekül sowie die Scavenger-Rezeptoren, die eine Vielzahl verschiedener Makromoleküle wie modifiziertes LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin und Lektine binden. Zu dieser Gruppe gehört auch das für Monozyten typische CD14-Antigen, welches den Rezeptor für das bakterielle Lipopolysaccharid darstellt. Zudem ist der Mannose-Rezeptor zu erwähnen, welcher die zuvor von den Toll-ähnlichen (*like*) Rezeptoren erkannten pathogenen Zelltrümmer bindet [106]. Komplement-Rezeptoren sind weitere Oberflächenmoleküle, die der Erkennung und Bindung von Komplementfaktoren dienen, die ihrerseits Antigene gebunden haben, was schließlich die Komplementkaskade aktiviert [104, 106].

1.4.1 Die Heterogenität von Makrophagen

Allgemein kann man zwei Haupttypen von Makrophagen unterscheiden. Zum einen die „klassisch aktivierten“ M1 Makrophagen, welche als Effektorzellen sowohl bei der Anti-Tumor Immunantwort als auch bei der Abwehr von Krankheitserregern involviert sind [104]. Zudem produzieren sie eine große Menge entzündungsfördernder Cytokine, wie Interleukine (IL-1, IL-6, IL-12) und Tumornekrosefaktor (TNF)- α , sowie reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies mittels induzierter Expression der Stickstoffmonoxid-Synthase [108]. Die Aktivierung der M1 Makrophagen erfolgt durch zwei Stimuli. Durch das Cytokin Interferon- γ (INF γ) werden die Makrophagen auf die Aktivierung vorbereitet. Mittels eines pathogenen Stimulus, wie zum Beispiel dem bakteriellen Zellwandbaustein Lipopolysaccharid (LPS), oder dem Tumornekrosefaktor kommt es schließlich zur Aktivierung durch die Toll-*like* Rezeptor (TLR) vermittelte Signaltransduktion des Tumornekrosefaktors [108, 109].

Zum anderen gibt es die M2 Makrophagen, welche in drei verschiedene Subtypen unterteilt werden können. Diese erfüllen neben der Kontrolle von Entzündungen die Beseitigung von Zelltrümmern, die Regulation der Wundheilung und der Tumorangiogenese [104, 108]. Dabei produzieren sie vorrangig entzündungshemmende Cytokine wie Interleukin-10 sowie den transformierenden Wachstumsfaktor (TGF)- β [108]. Zudem exprimieren sie verstärkt das Enzym Arginase, welches die Umsetzung von Arginin zu Ornithin katalysiert. Hieraus wiederum werden Prolin oder Polyamine gebildet, die für die Proliferation und Regeneration wichtig sind [110]. Bei der Aktivierung der mannigfaltigen M2 Makrophagen sind hauptsächlich Interleukine beteiligt. Denn durch die Stimulation der Makrophagen mit IL-4 und IL-13 oder IL-10 entstehen jeweils „alternativ aktivierte“ M2a oder M2c Makrophagen. Letztere sind für die Unterdrückung der Immunantwort, sowie die Gewebereparatur und Gewebeumgestaltung verantwortlich [108]. M2a Makrophagen dienen, wie auch die M1 Makrophagen, der Pathogenabwehr durch Stimulation der Proliferation von B-Lymphozyten und Aktivierung der humoralen Immunantwort (Sekretion von Antikörpern und Komplementfaktoren) [106]. Der M2b Subtyp wird aktiviert durch die Bindung von Immunkomplexen (Komplexe aus Antigen und Antikörper) in Kombination mit LPS oder Interleukin-1 Rezeptor-Liganden (z.B. IL-1 α oder IL-1 β) an Toll-*like* Rezeptoren [108]. Da sie sowohl entzündungsfördernde als auch entzündungshemmende Cytokine ausschütten können, sind sie maßgeblich an der Regulation der Immunantwort beteiligt [108].

Eine weitere Gruppe der Makrophagen stellen die Tumor-assoziierten Makrophagen, kurz TAMs, dar. Da diese sowohl einen M1 als auch einen M2 Phänotyp aufweisen können, lassen sich TAMs nicht in einen spezifischen Subtyp einteilen. Allerdings konnte

gezeigt werden, dass die M1-polarisierten TAMs mit einem positiven Verlauf der Tumor-Progression assoziiert sind, da diesen anti-neoplastische Effekte zugeschrieben werden. Im Gegensatz dazu vermitteln M2-polarisierte TAMs eine negativ begünstigte Tumor-Progression, weil sie das Tumorstadium auf verschiedenen Ebenen unterstützen [110]. Jedoch konnten Duluc und Kollegen einen neuen M2-Subtyp, die M2d Makrophagen, für M2-polarisierte TAMs identifizieren, welche Merkmale Tumor-assoziierter Makrophagen aufweisen [111].

Die Differenzierung der Makrophagen kann durch den Einfluss von Koloniestimulierenden Faktoren induziert werden. So bewirkt GM-CSF (*granulocyte-macrophage-colony stimulating factor*) die Differenzierung der Monozyten zu M1 Makrophagen und M-CSF (*monocyte-colony stimulating factor*) die Entwicklung von M2 Makrophagen [108].

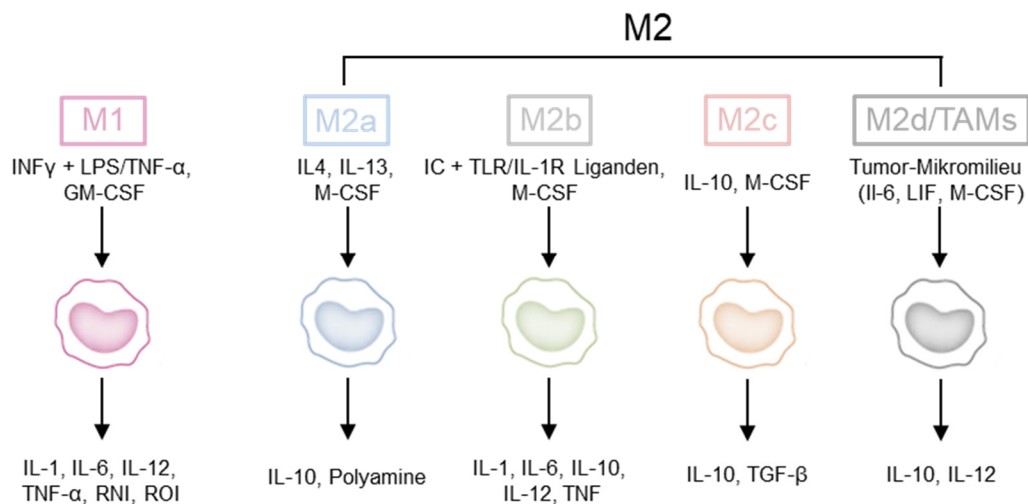


Abb.5: Übersicht der Makrophagen Haupt- und Subtypen. Die Differenzierung der Monozyten zu den verschiedenen Makrophagen erfolgt durch vielfältige Stimuli. In Abhängigkeit von der Funktion sezernieren die unterschiedlichen Makrophagen-Typen verschiedenste Effektormoleküle. Die Abbildung wurde adaptiert nach Mantovani et al., 2004 [108]. Noch nicht im Text beschriebene Abkürzungen: RNI/ROI: reaktive Stickstoff-/ Sauerstoff-spezies; IC: Immunkomplex; LIF: *leukemia inhibitory factor*.

1.4.2 Regulation des Differenzierungsprozesses von Makrophagen

Generell geht der Differenzierungs- beziehungsweise Aktivierungsprozess von Makrophagen mit einer strengen Koordination und Regulation verschiedener Signalwege auf transkriptioneller- und posttranskriptioneller Ebene einher. Die Haupt-Transkriptionsfaktoren stellen die STAT-Proteine dar, welche durch die Januskinase aktiviert werden [107]. Der JAK/STAT-Weg wird wiederum durch die Bindung von $\text{INF}\gamma$ an den Interferon-Gamma-Rezeptor 1/2 auf der Zelloberfläche ausgelöst und aktiviert

den Transkriptionsfaktor NF- κ B [112]. Dadurch erfolgt der Differenzierungsprozess durch STAT1 oder STAT3 zu M1 Makrophagen [107, 113]. Durch den Einfluss der Interleukine-4 und -13 kommt es ebenfalls zur Januskinase1/2/3 vermittelten Aktivierung von STAT6 oder zur PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) vermittelten Stimulierung von AKT1 und mTOR, was jeweils zu einer Ausprägung von M2 Makrophagen führt. Allerdings können diese beiden Interleukine auch zur Differenzierung von M1 Makrophagen führen. Hierbei kommt es zur Anregung von AKT2 und NF- κ B durch PI3K [107]. Auch durch GM-CSF kann es zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges kommen. Dabei regulieren JAK2 und STAT5 den Differenzierungsprozess von M1 Makrophagen über eine gesteigerte Expression der CIS (*cytokine-inducible SH2-containing protein*) und PIM1 mRNAs in Monozyten [114]. Da PIM1 als Masterregulator zellulärer Prozesse bekannt ist [85], kann dieser Kinase möglicherweise auch eine Funktion bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen oder der Umpolarisierung von M1/M2 Makrophagen zugeschrieben werden. Des Weiteren koordinieren die Transkriptionsfaktoren AP-1 (*activator protein*) [115] sowie IRF-1, -5 und -8 (*interferon-regulatory factor*) die Differenzierung zu M1 Makrophagen [110] und IRF-4 die phänotypische Ausprägung von M2 Makrophagen [116]. Zudem regulieren der durch STAT6 gesteuerte *peroxisome proliferator-activated receptor* PPAR- γ [107, 117] und das *cAMP-responsive element-binding protein* CREBP [118] ebenfalls die Differenzierung von M2 Makrophagen.

1.5 Zielstellung

Das Proto-Onkogen PIM1 ist eine konstitutiv aktive Serin/Threonin Kinase, die essentielle zelluläre Prozesse in der Zelle reguliert [48]. Als Onkogen ist PIM1 in vielen verschiedenen Krebsarten, wie Lymphomen, Leukämie und soliden Tumoren der Leber [83] und des Dickdarm [84], überexprimiert. Hierbei steuert die *prosurvival* Kinase den Zellzyklus, das Zellwachstum, die Differenzierung und Migration von Zellen, sowie deren Apoptose, weshalb hohe PIM1 Level oft mit schlechten Tumorprognosen und Metastasenbildung einhergehen [57, 62]. Trotz der Funktion als Masterregulator vieler wichtiger Signalwege [85] hat ein Knockout dieser Kinase in Mäusen gezeigt, dass ein Verlust lediglich zu einem gering veränderten Phänotyp führt [88]. Deshalb stellt PIM1 ein vielversprechendes Zielmolekül für die Krebstherapie dar [86].

Statine wirken als kompetitive Inhibitoren der HMG-CoA Reduktase, dem Schlüsselenzym der endogenen Cholesterin-Biosynthese, welche in der Leber abläuft [24]. Eine Hemmung des Syntheseweges bewirkt die Verringerung des LDL-Cholesterinspiegels im Blut sowie eine verminderte Bildung von Isoprenoiden, welche

ein weiteres Endprodukt des Mevalonatweges darstellen [29]. Auf Grund der gehemmten Synthese der Isoprenoide vermitteln Statine ihre pleiotropen Effekte auf Zellen [23]. Die bereits bekannten Wirkmechanismen von Statinen, wie die Förderung der Apoptose und die Hemmung der Proliferation, Angiogenese, Tumordinvasion und Metastasenbildung in verschiedenen Krebszellen sowie deren Nebenwirkungen, hervorgegangen aus Behandlungsstudien der Hypercholesterinämie und Krebstherapie, machen Statine zu einem potentiell geeigneten Medikament zur Bekämpfung von Tumoren. Dennoch sind bislang die genauen molekularen Mechanismen der Statin-Wirkung noch nicht vollständig aufgeklärt, sodass bisher noch kein therapeutischer Ansatz für Statine zur Behandlung von Tumoren entwickelt werden konnte [21-23, 39].

Das erste Projekt befasst sich mit der Charakterisierung der Statin-vermittelten Runterregulation von PIM1 in Krebszellen. Hierfür wurde die Wirkung von Simvastatin auf die verschiedenen Regulationsebenen (transkriptionell, posttranskriptionell, translationell und posttranslationell) von *Pim-1* in den Krebszelllinien der Leber (HepG2) und des Dickdarms (LS174T) analysiert. Ausgangspunkt war die bereits publizierte Regulation der *Pim-1* mRNA durch miR-33a, welche im *Srebp-2* Gen lokalisiert ist und daher zusammen mit *Srebp-2* co-transkribiert wird. Dies konnte in den Tumorzelllinien K562 und LS174T gezeigt werden [35, 71]. Da unter Statin-Gabe die Expression von *Srebp-2* und miR-33a in den Leberzellen erhöht ist, ergaben sich bereits erste Hinweise, dass PIM1 ein mögliches Zielmolekül von Statinen darstellt.

Das zweite Projekt beschäftigt sich mit der Untersuchung der Funktion von PIM1 in gesunden, primären Zellen. Dafür wurden Monozyten aus Spenderblut isoliert und zu M1 Makrophagen differenziert, welche eine Anti-Tumor-Antwort des Immunsystems auslösen. Zur Analyse der Funktion von PIM1 als Differenzierungsregulator wurden die *Pim-1* mRNA- und Proteinlevel in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Monozyten und Makrophagen ausgewertet.

2. Material und Methoden

2.1 Allgemeine Materialien

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer, Medien, Lösungen und Geräte sind in den Kapiteln der einzelnen Methoden beschrieben. Die hierfür eingesetzten Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen Merck KG, Carl Roth GmbH&Co, Sigma Aldrich oder Gerbu Biotechnik GmbH bezogen. Alle Puffer wurden mit deionisiertem Wasser oder doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt. In Abhängigkeit von der benötigten Sterilität oder Dauer der Lagerung wurden die Puffer, Medien und Lösungen, sowie die Pipettenspitzen, bei 121°C und 1 bar für 20 min autoklaviert (Systec V 95).

2.2 Primer

Primer sind kurze, einzelsträngige Oligonukleotide, die komplementär oder teilweise komplementär, wie im Falle der *in vitro* Mutagenese-Primer, zum Matrizenstrang sind. Dabei begrenzen sie den zu amplifizierenden Genabschnitt. Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Primer handelt es sich um DNA Primer, welche bei den einzelnen Methoden aufgeführt sind. Sie wurden gebrauchsfertig in einer Konzentration von 100 µM, gelöst in ddH₂O, entweder von der Firma Metabion oder von der Firma Thermo Scientific™ bezogen. Bei Letzteren handelt es sich um für die cDNA-Synthese eingesetzten Random Hexamer-Primer, welche aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden bestehen. Das Entwerfen der Primer erfolgte mit Hilfe des Programms SnapGene (2.12.4).

2.3 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Erst- und Zweitantikörper wurden von den Firmen Santa Cruz Biotechnology oder Cell Signaling Technology bezogen und jeweils entsprechend den Herstellerangaben bei 4°C oder -20°C gelagert. Eine Auflistung der eingesetzten Erstantikörper, sowie der Zweitantikörper ist in den Tabellen 1 und 2 dargestellt. Die genauen Bedingungen der verschiedenen Western Blots bezüglich der Antikörperkonzentration und Inkubationsdauer sind in den Bildunterschriften im Ergebnisteil angeführt.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Erstantikörper

Name Erstantikörper	Firma	Bestellnummer	Isotyp	Verdünnung	Inkubationszeit
β-Aktin (C4)	Santa Cruz	sc-47778	Maus monoklonal IgG ₁	1:20000 1:30000	1 h bis 2 h 20 min
MAP-LC3α/β (G4)	Santa Cruz	sc-398822	Maus monoklonal IgG ₁	1:1000	Über Nacht
Pim-1 (C93F2)	Cell Signaling	3247	Kaninchen monoklonal IgG	1:1000	Über Nacht
Pim-1 (12H8)	Santa Cruz	sc-13513	Maus monoklonal IgG ₁	1:500	Über Nacht
Sumo-1 (D-11)	Santa Cruz	sc-5308	Maus monoklonal IgG ₃	1:500	Über Nacht
Sumo-2/3/4 (C-3)	Santa Cruz	sc-393144	Maus monoklonal IgG ₁	1:500	Über Nacht
TTP (N18)	Santa Cruz	sc-8458	Ziege polyklonal IgG	1:2000	Über Nacht

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Zweitantikörper

Name Zweitantikörper	Firma	Bestellnummer	Verdünnung	Inkubationszeit
Anti-mouse IgG-HRP	Cell Signaling	7076	1:5000	45 min
Anti-rabbit IgG-HRP	Cell Signaling	7074	1:3000 1:5000	40 min bis 1 h
Donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2020	1:6000	30 min
Goat anti mouse IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2005	1:4000 1:10000	1 h bis 2 h
m-IgGk BP-HRP	Santa Cruz	sc-516102	1:4000 1:30000 1:20000	45 min bis 2 h 30 min

2.4 Größenmarker

Zur Größenanalyse der Protein- und DNA-Moleküle mittels Gelelektrophorese wurden folgende, in Tabelle 3 aufgelistete Marker verwendet.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Größenmarker

Größenmarker	Firma	Größenbereich	Verwendungszweck
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific™	10 - 250 kDa	Western Blot
1 kb DNA Ladder	Cytogen	0,3 – 10 kb	Agarosegelelektrophores

2.5 Plasmide

Plasmide sind DNA-Moleküle, die unabhängig von genomischer DNA in prokaryotischen Zellen-, sowie Mitochondrien und Plastiden zu finden sind. Sie sind zirkular und können in ihrer Größe variieren. In der Molekularbiologie stellen die sogenannten Vektoren ein wichtiges Werkzeug zur Vermehrung und Analyse von Genen oder Proteinen dar. Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden für Untersuchungen in eukaryotischen Zellen eingesetzt.

2.5.1 pCMV6-XL4 PIM1 cDNA Konstrukt

Bei diesem Plasmid handelt es sich um ein Volllänge (Wildtyp) Pim1 cDNA Klon (PubMed Accession-Nr.: NM_002648.2 hsa PIM1 oncogene, Vektor: pCMV6-XL4, OriGene, Kat.-Nr.: SC110975) zur ektopischen Expression von PIM1 in PIM1- Protein negativen humanen Krebszellen (Skov3) [71]. Die Gesamtgröße des Vektors umfasst 7,3 kb, die sich aus 4,7 kb Plasmidbackbone und 2,6 kb *Pim-1* cDNA Insert zusammensetzt. Im Plasmidbackbone befindet sich ein vor dem Insert gelegener CMV-Promotor (Cytomegalovirus), zur ektopischen Expression in den humanen Krebszellen. Weiterhin ist eine Ampicillin-Kassette, zur Selektion der DH5α Zellen nach der Transformation, vorhanden.

2.5.1.1 pCMV6-XL4 PIM1 Δ3'-UTR cDNA Konstrukt

Dieser Klon wurde von Maren Thomas generiert. Das Plasmid wurde zur Analyse der posttranskriptionellen Regulation von *Pim-1* in Skov3 Zellen verwendet, da dem ca. 6 kb

großen PIM1 cDNA Konstrukt ungefähr zwei Drittel der 3'-UTR von *Pim-1* fehlen, einschließlich der miR-33a Bindestelle und dem TTP Konsensus-Bindemotiv [119]. Diese Deletion erfolgte über einen Verdau des pCMV6-XL4 PIM1 Wildtyp Konstruktes mit dem Restriktionsenzym HindIII.

2.5.1.2 pCMV6-XL4 PIM1 3'mut33a cDNA Konstrukt

Dieses Plasmid wurde ebenfalls von Maren Thomas kloniert. Es ist ein Vollängen PIM1 cDNA Konstrukt mit einer mutierten miR-33a Bindestelle. Aus diesem Grund wurde das Plasmid für Untersuchungen zum Einfluss von endogenem oder ektopischem miR-33a auf die *Pim-1* Expression herangezogen.

2.5.2 pFR_HCV_xb Luciferase-Reporter Konstrukte

Diese Promotor-Konstrukte wurden generiert um den Einfluss von STAT3 auf die Transkription von *Pim-1* zu analysieren. Mit Hilfe der Firefly-Luciferase konnte die Transkriptionsaktivität von *Pim-1* gemessen werden. Eine der Renilla-Luciferase vorgelagerte HCV-IRES diente der *Pim-1* unabhängigen Messung der Transfektionseffizienz. Zudem besitzt das ca 6 kb große pFR_HCV_xb Plasmid (Addgene, Best.-Nr.: 11510) eine Ampicillin-Kassette zur Selektion der DH5 α Zellen nach Transformation (2.6.5).

Das Leerplasmid wurde als Kontrolle verwendet um den Einfluss von Simvastatin (2.7.11) auf den Vektor zu analysieren.

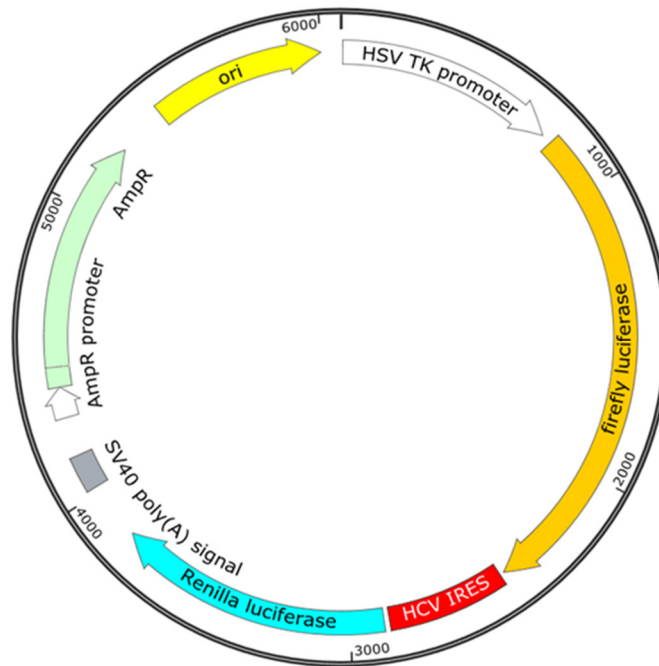


Abb.6: Plasmidkarte des pFR_HCV_xb Vektors.

2.5.2.1 pFR_HCV_xb Plasmid ohne HSV TK-Promotor

Dieses Plasmid wurde zur Normierung des allgemeinen Firefly-Luciferase Hintergrundsignals hergestellt. Hierfür wurde der ca. 750 bp große HSV TK-Promotor mittels *HindIII* und *BglII* (FastDigest, Thermo Scientific™) (2.5.2.1) aus dem pFR_HCV_xb Leervektor geschnitten (2.11.4) und zur Trennung beider DNA-Fragmente auf ein Agarosegel (2.9.2.1) gebracht. Danach erfolgte die Aufreinigung des verdauten Vektors (2.11.11) über das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Die durch den Restriktionsverdau entstandenen Überhänge des linearisierten Plasmides wurden dann mit Hilfe des Klenow-Fragmentes (Thermo Scientific™) (2.11.6) am 5'-Ende mit Nukleotiden aufgefüllt beziehungsweise am 3'-Ende abgebaut. Schließlich erfolgte nach Ligation (2.11.7) mit der T4-Ligase (Thermo Scientific™) die Überprüfung des Konstruktes durch ein Testverdau mit *BamHI* und *EcoRI* (FastDigest, Thermo Scientific™) und eine Sequenzierung (2.11.12).

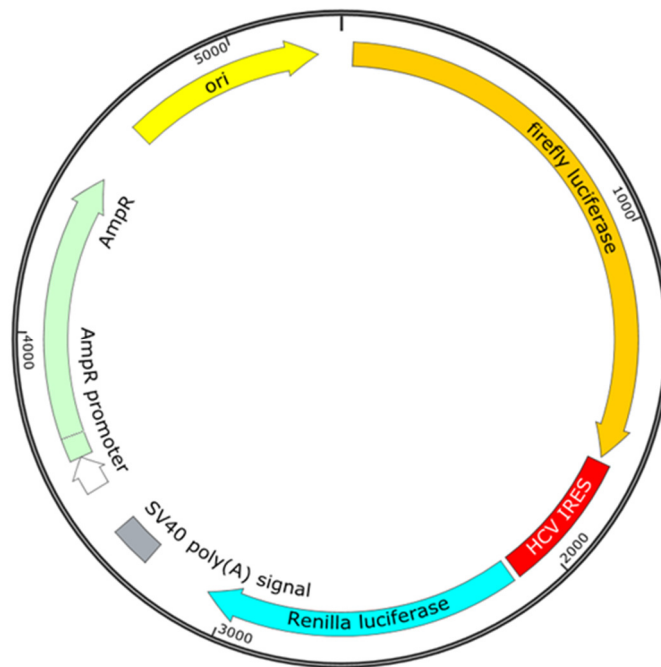


Abb.7: Plasmidkarte des pFR_HCV_xb-HSV-TK Promotor Konstruktes.

2.5.2.2 Wildtyp Pim-1 STAT3 BS Promotor-Konstrukt

Zur Generierung dieses Klons wurde ein ungefähr 1 kb großer DNA-Abschnitt mit dem darin befindlichen Promotor und Teile des codierenden Bereichs von *Pim-1* aus der genomischen DNA von Hela Zellen amplifiziert. Dieser Bereich umfasst eine Länge von ca. 1,4 kb und wurde vor die Firefly-Luciferase kloniert, anstelle des HSV TK-Promotors. Die Amplifizierung des DNA-Bereichs mit dem darin befindlichen *Pim-1* Promotor (2.11.10.1) und des Plasmidbackbones (2.11.10.2) erfolgte über je eine PCR mit 5'-Überhang-Primern. Nach Aufreinigung beider PCR-Ansätze (2.11.11) konnten anschließend beide Amplifikate mittels Gibson Assembly® (New England BioLabs) ligiert (2.11.8) und transformiert werden (2.6.5). Die neun Nukleotide lange STAT3-Bindestelle (BS) wurde mit dem Motiv-Analysenprogramm *Homer* (2.12.3) innerhalb dieses DNA-Abschnittes von *Pim-1* mit einem score von 9,55 vorhergesagt und ist mit der Konsensussequenz aus der Literatur übereinstimmend [120]. Über Kolonie-PCR (2.11.10.4) und Sequenzierung (2.11.12) konnten die korrekten Klone, welche eine Gesamtgröße von ungefähr 6,7 kb aufweisen, ermittelt werden.

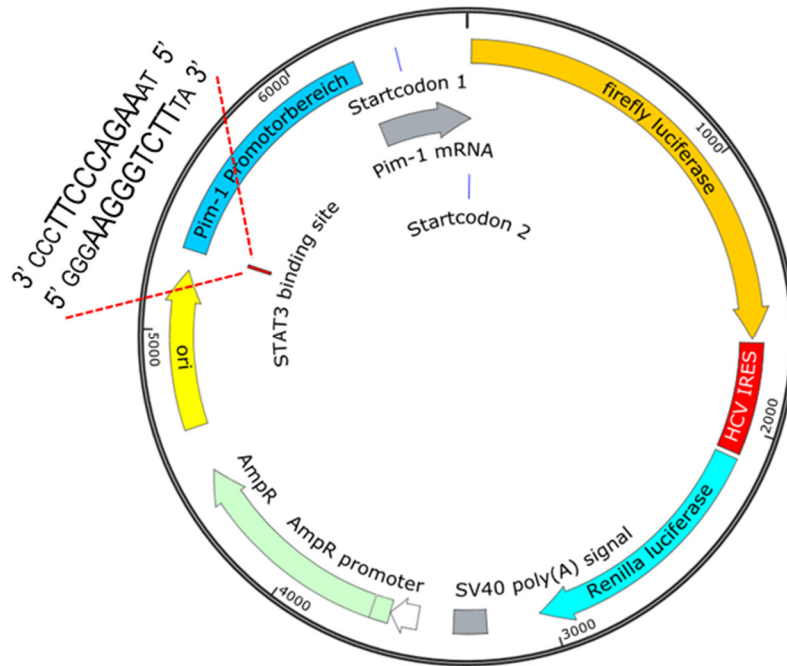


Abb.8: Plasmidkarte des pFR_HCV_xb+Pim-1-STAT3 BS Wildtyp Konstruktes. Die STAT3-Bindestelle ist vergrößert gezeigt. Die in Kleinbuchstaben abgebildeten Nukleotide stellen die flankierende Sequenz der in Großbuchstaben abgebildeten Konsensussequenz der STAT3-Bindestelle des *Pim-1* Promotors dar.

2.5.2.3 Pim-1 STAT3 BS mit Promotor-Konstrukt

Die Klonierung dieses Plasmides erfolgte ebenso über PCR (Tabelle 18 bis 20), wobei das pFR_HCV_xb+Pim-1 STAT3 BS WT Promotor-Konstrukt als Ausgangsplasmid diente. Zur Beseitigung methylierter DNA erfolgte ein *DpnI*-Verdau (Thermo Scientific™) (2.11.5), der im Anschluss in DH5α Zellen transformiert (2.6.5) wurde. Bei diesem Konstrukt wurde über eine *in vitro* Mutagenese (2.11.10.3) nach dem Prinzip von Quik Change® XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) die Mutation der STAT3-Bindestelle eingefügt. Sie liegt ca. 1,1 kb stromaufwärts vom ersten Startcodon der *Pim-1* mRNA

Hierbei wurden 4 Nukleotide der STAT3-Bindestelle (BS) und 3 umliegende Nukleotide ausgetauscht. Die Richtigkeit der Klone wurde mit Hilfe der Kolonie-PCR (2.11.10.4) und Sequenzierung (2.11.12) überprüft.

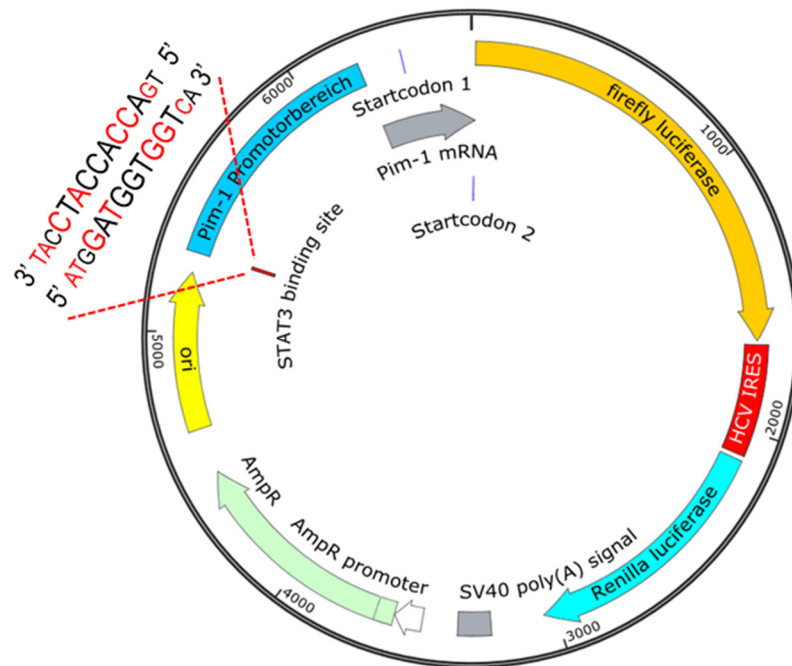


Abb.9: Plasmidkarte des pFR_HCV_xb+Pim-1-STAT3 BS mut2 Konstruktes. Die STAT3-Bindestelle ist vergrößert gezeigt. Die in Kleinbuchstaben abgebildeten Nukleotide stellen die flankierende Sequenz der in Großbuchstaben abgebildeten Konsensussequenz der STAT3-Bindestelle des *Pim-1* Promotors dar. Rot gekennzeichnete Nukleotide wurden gegenüber dem Wildtyp ausgetauscht.

2.5.2.4 Pim-1 STAT3 BS mut2 Promotor-Konstrukt

Bei diesem Klon wurde ebenfalls über eine *in vitro* Mutagenese (2.11.10.3, Tabelle 18 bis 20) nach dem Prinzip der Site-Directed-Mutagenese durch inverse PCR (Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit, New England BioLabs) die Mutation der STAT3-Bindestelle eingefügt. Als Ausgangsplasmid diente dabei das pFR_HCV_xb+Pim-1 STAT3 BS mut Promotor-Konstrukt. Da bei dieser Vorgehensweise ein DNA-Fragment mit glatten, freien 5'-OH-Enden entsteht, wurden diese nach Aufreinigung des PCR-Produktes (2.11.11) mittels T4 Polynukleotidkinase (Thermo Scientific™) phosphoryliert (2.11.3). Anschließend wurde der gesamte Phosphorylierungsansatz mit *DpnI* (Thermo Scientific™) verdaut (2.11.5) und die Enden mit Hilfe der T4-Ligase (Thermo Scientific™) (2.11.7) verknüpft, bevor die Transformation in DH5α Zellen (2.6.5) erfolgte. Im Gegensatz zu dem Pim-1 STAT3 BS mut Konstrukt sind hier alle 9 Nukleotide der STAT3-Bindestelle ersetzt. Erneut wurden die generierten Klone durch Einsatz einer Kolonie-PCR (2.11.10.4) und einer Sequenzierung (2.11.12) auf ihre Korrektheit kontrolliert.

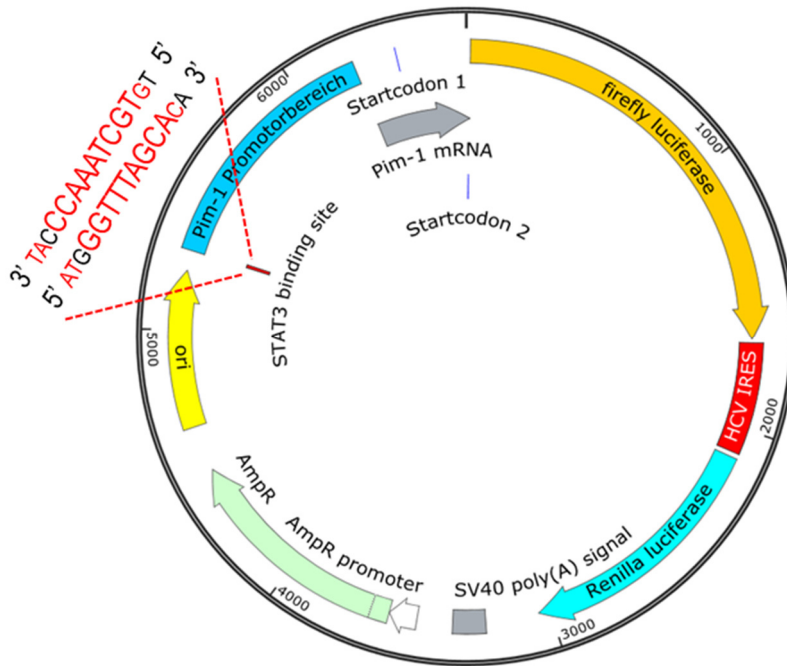


Abb.10: Plasmidkarte des pFR_HCV_xb+Pim-1-STAT3 BS mut2 Konstruktes. Die STAT3-Bindestelle ist vergrößert gezeigt. Die in Kleinbuchstaben abgebildeten Nukleotide stellen die flankierende Sequenz der in Großbuchstaben abgebildeten Konsensussequenz der STAT3-Bindestelle des *Pim-1* Promotors dar. Rot gekennzeichnete Nukleotide wurden gegenüber dem Wildtyp ausgetauscht.

2.6 Bakterielle Zellkultur

Die bakterielle Zellkultur ist eine Standardmethode in der Molekularbiologie. Sie findet vor allem Anwendung bei der Klonierung. Denn so ist es einfach möglich Plasmide mit Hilfe der Bakterien zu vermehren. Alle dafür verwendeten Materialien, Medien und Lösungen müssen hierfür steril sein und wurden aus diesem Grund für 20 min bei 121°C und einem Druck von 1 bar autoklaviert (Systec V 95).

2.6.1 Bakterienstämme

Für alle Klonierungsexperimente wurde der gram-negative Bakterienstamm *E.coli* DH5α (Genotyp: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*; [121]) verwendet, welcher speziell hierfür, durch Einfügen verschiedener Mutationen, generiert wurde. Somit weist dieser *E.coli* Stamm unter anderem eine höhere Transformationseffizienz auf [122].

2.6.2 Kultivierung von Bakterien auf Agarplatten

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurden 15 g/L Agar zum LB-Medium (Lysogeny Broth; [123]; 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Pepton, 10 g/L NaCl, pH 7,5) gegeben, autoklaviert und auf ungefähr 50°C abgekühlt. Dem LB-Agar wurden weiterhin 100 µg/ml Ampicillin (Stammlösung: 100 mg/ml) hinzugefügt um transformierte DH5α Zellen zu selektieren. LB-Agarplatten wurden verwendet um Bakterien aus Glycerinstocks auszustreichen oder um die Bakterien nach Transformation auszuplattieren. Diese wurden dann über Nacht bei 37°C im Brutschrank (Memmert BE 400) inkubiert.

2.6.3 Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedium

Zur Vermehrung der DH5α Zellen wurde eine einzelne Bakterienkolonie von einer LB-Agarplatte gepickt oder direkt aus einem Glycerinstock in LB-Medium (Lysogeny Broth; [123]; 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Pepton, 10 g/L NaCl, pH 7,5) angeimpft. Zur Selektion der Bakterien, die das gewünschte Plasmid aufgenommen haben, wurden noch 100 µg/ml einer 100 mg/ml Ampicillin-Stammlösung zum LB-Medium hinzugegeben. Die Kultivierung der Zellen in Flüssigmedium erfolgte über Nacht bei 37°C mit 220 rpm in einem Schüttelinkubator (GFL 3033).

Zur längeren Lagerung der klonierten Plasmide oder Bakterienstämme wurde eine Übernachtskultur 1:1 mit sterilen 98 %igen Glycerin gemischt, zuerst in flüssigem Stickstoff und anschließend bei -80°C eingefroren.

2.6.4 Präparation chemisch kompetenter *E.coli* DH5α Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* DH5α Zellen wurden 3 ml einer Übernachtskultur zu 150 ml vorgewärmten LB-Medium gegeben und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6 schüttelnd bei 200 rpm inkubiert (GFL 3033). Nach einer 10-15 minütigen Präinkubation auf Eis wurden die Zellen bei 5000 rpm und 4°C für 7 min zentrifugiert (Thermo Scientific™ Heraeus™ Fresco™ 17). Anschließend wurde das Zellpellet vorsichtig in 15 ml vorgekühlter TBE 1-Lösung (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, pH 7) resuspendiert und erneut in gleicher Weise zentrifugiert. Nun wurde das Pellet in 6 ml vorgekühlter TFB 3-Lösung (100 mM MOPS, 50 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15 % Glycerin, pH 6,5) resuspendiert und als 150 µl Aliquots sofort in flüssigen Stickstoff gegeben um sie anschließend bei -80°C zu lagern.

2.6.5 Transformation von Bakterien

Die Transformation ist eine Standardmethode in der Molekularbiologie und stellt eine Möglichkeit des Gentransfers dar. Sie bezeichnet die Aufnahme freier DNA in kompetente Bakterienzellen, Pilze, Pflanzen, Algen und Hefezellen. Entwickelt wurde diese Methode 1928 von Griffith [124].

Als Vorbereitung wurden die chemisch kompetenten DH5 α Zellen auf Eis aufgetaut. Dann wurden bis zu 700 ng Plasmid-DNA oder 5-10 μ l Ligationsansatz beziehungsweise 2 μ l einer 1:4-Verdünnung des Gibson-Assembly Mastermixes (2.11.8) zu 50 μ l der DH5 α Zellen gegeben und für ca. 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock der *E.coli* Zellen erfolgte bei 42°C für 1 min (Biometra TB1 Thermoblock). Im Anschluss daran wurde die DNA-Bakterien-Suspension erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 450 μ l vorgewärmten LB-Medium ohne Ampicillin wurden die DH5 α Zellen für 50-60 min bei 37°C geschüttelt (Eppendorf Thermomixer 5436). Abschließend wurden die transformierten Zellen auf Agarplatten mit 100 μ g/ml Ampicillin ausgestrichen (2.6.2).

2.7 Zellkultur adhärenter, humaner Zellen

Die Zellkultur humaner Zellen verlief unter sterilen Bedingungen. Alle Arbeiten wurden unter der Sterilbank (HERAsafe™, Thermo Scientific™) durchgeführt. Die Kultivierung der humanen Zellen erfolgte in T75 Zellkulturflaschen (Sarstedt) oder 6-Well Platten (Greiner Bio One) bei erhöhter Luftfeuchtigkeit (circa 95%), 37°C und 5 % CO₂ (CO₂ Air-Jacketed Incubator, NuAire™). Die verwendeten Zelllinien stammen aus isolierten Tumoren verschiedener Organe und Gewebetypen. Sie besitzen die Fähigkeit unendlich zu wachsen, weshalb sie über einen langen Zeitraum *in vitro* kultiviert werden können. Primäre Zellen, wie Monozyten, wurden hingegen aus dem Blut verschiedener Spender isoliert und sind nicht proliferierend im Sinne der Zellteilung. Demnach variieren die Zellen von Spender zu Spender.

2.7.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien

Die Kultivierung adhärenter, humaner Zelllinien erfolgte in T75 Zellkulturflaschen (Sarstedt) mit IMDM Medium (Iscove's Modified Dulbecco Medium, Life Technologies) und 10 % fetalem Kälberserum (Biochrom). Die Zellen wurden zwei Mal pro Woche subkultiviert. Hierfür wurde zu Beginn das verbrauchte Medium aus der Zellkulturflasche abgenommen und mit 10 ml 1x PBS (*phosphate buffered saline*) pH 7,4 (Life Technologies) gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden diese für 5min bei 37°C in 5 ml 1x Trypsin-EDTA-Lösung in PBS (Biochrom) inkubiert (CO₂ Air-Jacketed Incubator,

NuAire™). Um die Reaktion abzustoppen, wurden der Zellsuspension 5 ml Medium zugesetzt und der Ansatz bei 390 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (Hettich Universal 320). Das Zellpellet wurde nun in 1 bis 2 ml Medium gelöst und entsprechend der gewünschten Verdünnung in eine neue Zellkulturflasche mit 25 ml Medium überführt.

2.7.2 Bestimmung der Zellzahl

Für die verschiedenen Zellexperimente wurde immer eine definierte Zellanzahl eingesetzt. Hierfür wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld Superior, Hemocytometer Neubauer brightline) ausgezählt. Diese Zählkammer ist eine Glasplatte mit einem eingezätzten Zählnetz, welches aus vier großen Quadraten besteht, die sich wiederum in jeweils 16 kleinere Quadrate unterteilen. Zum Zählen wurde ein leicht angefeuchtetes Deckglas über das Zählnetz gelegt und ungefähr 10 µl einer Verdünnung der Zellsuspension dazwischen pipettiert. Ausgezählt wurden jeweils die vier großen Quadrate und anschließend den Mittelwert daraus ermittelt. Die Gesamtzahl der Zellen berechnet sich dann mit folgender Gleichung (Gleichung 1; [125])

Gleichung 1:

Zellzahl = Mittelwert der Zellen · 10 000 (Kammerfaktor) · V (Zellsuspension) · Verdünnung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte immer nach dem Abstoppen der Trypsin-Inkubation.

2.7.3 HeLa Zellen

Die HeLa Zellen wurden 1951 aus einem Karzinom des Gebärmutterhalses einer 51 Jahre alten Frau namens Henrietta Lacks gewonnen. Sie stellen die erste etablierte Zelllinie dar [126]. Die Kultivierung von HeLa Zellen erfolgte wie oben beschrieben.

2.7.4 HepG2 Zellen

Die humane Zelllinie HepG2 wurde aus einem gut differenzierten Leberkarzinom eines 15 jährigen Jungen aus Argentinien isoliert [127]. 2009 konnte durch histopathologische Untersuchungen und ein genetisches Profil gezeigt werden, dass es sich bei den entarteten Zellen um ein Hepatoblastom des Epithelgewebes handelte [128]. Die HepG2

Zellen wurden kultiviert wie eingangs beschrieben. Die Subkultivierung erfolgte durch eine 1:4 oder 1:5 Verdünnung.

2.7.5 LS174T Zellen

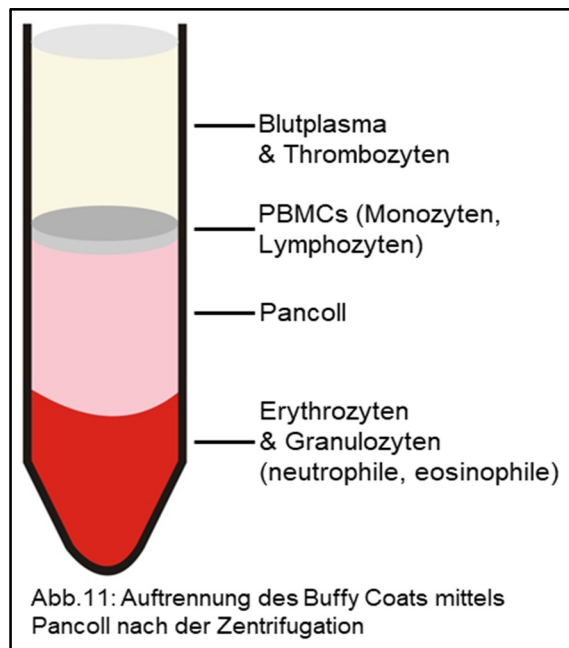
Die LS174T Zellen stellen eine mit Trypsin behandelte Variante der Dickdarm Adenokarzinom-Zelllinie LS180 dar, welche aus einer 58 Jahre alten Patientin isoliert wurden [129]. Die Zellen wurden, wie unter Punkt 2.7.1 dargelegt, kultiviert. Das Anfertigen von Subkulturen erfolgte in einer 1:8 oder 1:10 Verdünnung.

2.7.6 Skov3 Zellen

Die Zelllinie Skov3 stammt aus einem Adenokarzinom des Eierstocks, welche 1973 aus einer 64 Jahre alten Frau isoliert wurde [130]. Da diese Zellen kein PIM1 Protein exprimieren, wurden sie unter anderem für Transfektionsexperimente verwendet [71]. Die Kultivierung der Skov3 Zellen wurde, wie oben geschildert, durchgeführt. Subkulturen wurden jeweils im Verhältnis 1:8 oder 1:10 verdünnt.

2.7.7 Isolierung von PBMCs

Die Präparation von PBMCs (*per*iph*al* *b*lood *m*ono*n*uclear *c*ells) erfolgte aus Buffy Coats verschiedener Spender. Buffy Coats sind das Nebenprodukt einer Vollblutspende, hauptsächlich bestehend aus Thrombozyten, Leukozyten, Blutplasma und Erythrozyten. Zu Beginn wurde das Blut auf drei Mal 20 ml Pancoll (PAN™ Biotech) verteilt und bei 800 g für 25 min bei Raumtemperatur, mit ausgeschalteter Bremse, zentrifugiert. Dann wurde das Blutplasma bis zur weißen PBMC-Schicht des Pancoll-Gradienten abgenommen und verworfen. Nun konnten die PBMCs vorsichtig isoliert werden,



wobei es die Mitnahme von Pancoll möglichst zu vermeiden galt. Diese Schicht setzt sich aus Lymphozyten und Monozyten zusammen. Um das Pancoll zu entfernen, wurden die PBMCs mit ungefähr 50 ml 1x PBS pH 7,4 (Life Technologies) gewaschen. Hierfür

wurde die PBS-Zellmischung bei 500 g für 8 min bei 4°C zentrifugiert. Zur Präparation der Monozyten mit Hilfe der Gegenstromzentrifugation (Elutriation; 2.7.8.1) wurden abschließend die PBMCs in ca. 30 ml RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium; PAN™ Biotech; 25 mM HEPES, 2 g/L NaHCO₃), versetzt mit 2 mM L-Glutamin, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, resuspendiert. Erfolgte die Aufreinigung der Monozyten mittels CD14 Antikörper gelabelten Magnetic Beads (Miltenyi Biotec; 2.7.8.2) wurde das PBMC-Pellet mit in einem kleinen Volumen vorgekühlten MACS-Puffer (1x PBS pH 7,4; 0,5 % FCS; 0,2 mM EDTA) vorsichtig gelöst und anschließend auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt. Danach wurden die Zellen bei 300 g für 8 min bei 4°C wieder pelletiert und in 10 ml kaltem MACS-Puffer resuspendiert. Schließlich wurde ein Aliquot der PBMC-Lösung zum Auszählen der Zellen verwendet.

2.7.8 Isolierung von Monozyten aus PBMCs

2.7.8.1 Elutriation

Die Elutriation oder Gegenstromzentrifugation ist eine Methode zur Isolation von (Blut-)Zellen nach ihrer Größe und Dichte. Bei der Gegenstromzentrifugation wirken einerseits die nach außen gerichtete Zentrifugalkraft und andererseits die Zentripetalkraft des in die Zentrifuge hinein gepumpten Puffers. Durch Steigerung der Pumpleistung beziehungsweise Durchflussrate der Pufferlösung können die verschiedenen Blutzellen der PBMCs entsprechend ihrer Sedimentationseigenschaften fraktioniert werden [131].

Am Vortag der Monozyten-Präparation wurde die Zentrifuge mit einer 4,5 % H₂O₂-Lösung desinfiziert, kalibriert und auf ihre Dichtigkeit getestet. Bei der Kalibrierung wird die Pumpleistung ermittelt bei der 28,5 ml Wasser pro Minute die Zentrifuge durchlaufen. Dies ist notwendig um die Pumpleistung exakt für die Elutriation der Zellen entsprechend ihrer Sedimentationsrate einzustellen.

Am Tag der Elutriation wurde der hierfür benötigte 1x Elutriationspuffer (10x PBS; 0,1 % AB-Serum; 0,01 % EDTA) frisch hergestellt. Vor Beginn der Monozyten Isolation wurde die Zentrifuge mit kaltem 1x Elutriationspuffer bei voller Pumpleistung gespült. Nun konnten die zuvor isolierten PBMCs (2.7.7) in die Zentrifuge bei 3000 rpm eingezogen werden. Hierfür wurde eine Pumpleistung von 6-7 ml/min benötigt. Dann wurde wieder der 1x Elutriationspuffer eingesaugt und die Pumpleistung nach dem am Vortag erstellten Plan schrittweise erhöht. Dadurch kommt es zur Sortierung der verschiedenen Zellen des PBMC-Gemisches in der Elutriationskammer beziehungsweise zum Herauswaschen kleinerer Zellen mit geringerer Sedimentationsrate. Zuletzt erfolgte das

Auffangen der Monozyten bei einer Pumpleistung von 36 ml/min und ausgeschaltetem Rotor. Schließlich wurden die Monozyten bei 1300 rpm, 4°C für 7 min, ohne Bremse zentrifugiert und in 10 ml RPMI 1640 (PANTM Biotech; 25 mM Hepes, 2 g/L NaHCO₃, 2 mM L-Glutamin, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 4 % AB-Serum) aufgenommen um sie abschließend auszuzählen.

2.7.8.2 CD14 Magnetic Beads

Nach dem Auszählen der PBMCs wurde die gewünschte Menge an Zellen bei 450 g für 8 min bei 4°C zentrifugiert. Hierbei gilt es zu berücksichtigen, dass Monozyten nur circa 10 % des PBMC-Gemisches darstellen. Nun wurde der Überstand abgesaugt, in entsprechendem Volumen kalten MACS-Puffer resuspendiert und die CD14 Magnetic Beads zur Zellsuspension gegeben und vorsichtig gevortext. Die benötigte Menge an MACS-Puffer und Magnetic Beads berechnen sich aus der gewünschten Zellzahl. So wurden zum Beispiel für $5 \cdot 10^7$ PBMCs 80 µl Magnetic Beads eingesetzt. Bei einer benötigten Menge von 350 µl Magnetic Beads wurde $3,5 \cdot 320$ µl MACS-Puffer verwendet. Nach einer Inkubation von 20-30 min bei 4°C wurde das Zell-Beads-Gemisch erneut mit kaltem MACS-Puffer aufgefüllt (2 ml für $1 \cdot 10^7$ Monozyten) und bei 450 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in entsprechendem Volumen kaltem MACS-Puffer (500 µl für $1 \cdot 10^7$ Monozyten) vorsichtig resuspendiert. Zur Aufreinigung der Monozyten wurde das Zell-Beads-Gemisch gleichmäßig auf zwei im Magnetständer (Miltenyi Biotec) befindlichen Säulen (MACS Separation Columns, LS; Miltenyi Biotec) geladen. Diese wurden zuvor mit je 3 ml kaltem MACS-Puffer equilibriert. Anschließend wurde das Zell-Beads-Gemisch drei Mal mit jeweils 3 ml kaltem MACS-Puffer gewaschen und der Durchfluss verworfen. Schließlich wurden die Monozyten mit jeweils 5 ml kaltem MACS-Puffer eluiert und in der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt.

2.7.9 Kultivierung primärer Zellen

Nach der Aufreinigung der Monozyten aus PBMCs wurden $3 \cdot 10^6$ Zellen pro Well in RPMI1640 Medium mit 300 mg/l L-Glutamin (Lonza) in eine 6-Well Platte (Greiner Bio-One) ausgesät und für 2 Stunden zum Absetzen der Zellen im Brutschrank inkubiert (CO₂ Air-Jacketed Incubator, NuAireTM). Danach wurde dem Medium, mit einem Endvolumen von 3 ml, 1 % defibriniertes off-the-clot human AB-Serum (Biochrom) und 10 ng/µl human GM-CSF (Life Technologies) zugegeben. Durch die Behandlung der Zellen mit dem Wachstumsfaktor GM-CSF (*granulocyte-macrophage-colony stimulating factor*)

erfolgte die Differenzierung der Monozyten nach 5 bis 7 Tagen zu M1 Makrophagen [102]. Am 5. Tag der Kultivierung wurde die Hälfte des alten Mediums gegen frisches Medium mit allen seinen Zusätzen ausgetauscht. Die gesamte Kultivierungsdauer betrug 10 bis 12 Tage.

2.7.10 Ernte humaner Zelllinien und primärer Zellen

Die Zellernte erfolgte entweder durch direkte Lyse der Zellen im Well über Zugabe des ML-Puffers (Nucleospin® miRNA Isolationskit, Macherey-Nagel) oder durch Abkratzen der Zellen mit einem Zellschaber (Sarstedt). Bei der zuletzt genannten Methode wurden die Zellen bei 3000 rpm für 5 min pelletiert (Heraeus™ Biofuge™ Pico) und anschließend mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die Zellen für eine spätere SDS PAGE (2.8.1) vorbereitet und schließlich bei -20°C oder -80°C gelagert. Die Proben wurden zur weiteren Verwendung für RT-qPCR Experimente (2.11.10.5) im ML-Puffer bis zur RNA-Präparation (2.10.1) bei -80°C aufbewahrt.

2.7.11 Simvastatin-Behandlung humaner Zelllinien und primärer Zellen

Statine stellen ein im Handel bereits verfügbares Medikament zur Senkung des Cholesterin-Spiegels im Blut bei Fettstoffwechselstörungen dar. Sie können lipophile oder hydrophile Eigenschaften aufweisen. Da das Simvastatin (Sigma Aldrich) zu der lipophileren Form von Statinen gehört, wurde es in 250 µl DMSO (Dimethylsulfoxid, Carl Roth) gelöst, sodass es eine Konzentration von 48 mM aufweist. Für die experimentelle Verwendung wurden zunächst jeweils eine Arbeitslösung für Simvastatin, mit einer Konzentration von 1 mM, und DMSO angefertigt. Beide Lösungen wurden in gleichen Volumenverhältnissen mit Medium angesetzt. Die Zugabe der Menge an Arbeitslösung richtete sich nach der benötigten Endkonzentration der zu behandelnden Zellen (Tabelle 4). Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden im Brutschrank (CO₂ Air-Jacketed Incubator, NuAire™) wurden die Zellen entweder geerntet (2.7.10) oder mit weiteren Inhibitoren behandelt, wofür das Simvastatin auf den Zellen verblieb.

Tabelle 4: Übersicht der eingesetzten Simvastatin-Konzentrationen

Zellen	Simvastatin-Konzentration
HepG2	10 μ M
LS174T	25 μ M
Skov3	5 μ M

2.7.12 Mevalonat-Behandlung humaner Zelllinien

Mevalonat ist ein Zwischenprodukt des gleichnamigen Stoffwechselweges, dessen Synthese durch den Einsatz von Statinen gehemmt wird. Deshalb wurde Mevalonat (Sigma Aldrich) zur Aufhebung des zellulären Statin-Effektes eingesetzt. Die Inkubation der HepG2 Zellen mit 10 μ M Mevalonat erfolgte, wie für Statine, über 48 Stunden. Zunächst wurde das Mevalonat durch Zugabe von 250 μ l DMSO (Carl Roth) gelöst, was einer Stammkonzentration von 260 mM entspricht. Zur Herstellung der Mevalonat- und ihrer entsprechenden DMSO-Arbeitslösung wurden die Substanz mit dem Medium in gleichen Volumenverhältnissen gemischt.

2.7.13 Inhibition der Transkription in humanen Zelllinien

Zur Untersuchung des mRNA Abbaus wurden die HepG2 Zellen mit 10 μ g/ml α -Amanitin (Santa Cruz), gelöst in DMSO, nach einer von 24 stündigen Statin-Vorbehandlung (2.7.11) für 8 und 12 Stunden inkubiert. α -Amanitin stellt ein Transkriptioninhibitor dar, welcher mit hoher Spezifität und Affinität die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II bindet [132]. Für die Herstellung der Arbeitslösungen von α -Amanitin und DMSO (Carl Roth) wurden die Substanzen in gleichen Volumenverhältnissen jeweils mit Medium gemischt.

2.7.14 Inhibition der Translation in humanen Zelllinien

Die Behandlung der Zellen mit Cycloheximid (MedChemTronica), gelöst in DMSO, erfolgte nach einer 48 stündigen Statin-Präinkubation (2.7.11) für 6 Stunden in HepG2 Zellen und LS174T Zellen. Cycloheximid ist ein Inhibitor der Translationselongation, welcher spezifisch an die 60S Untereinheit der eukaryontischen Ribosomen bindet [133]. Die Herstellung der Arbeitslösungen für Cycloheximid und DMSO (Carl Roth) erfolgte jeweils in gleichen Volumenverhältnissen mit Medium. Die beiden Krebszelllinien HepG2

und LS174T wurden über den genannten Zeitraum entweder mit 45 μM oder 60 μM Cycloheximid inkubiert.

2.7.15 Inhibition des Proteinabbaus in humanen Zelllinien

Nach 48 Stunden Statin-Inkubation (2.7.11) wurden die Krebszellen mit in DMSO gelösten Bortezomib (MedChemTronica) behandelt, einem Inhibitor des eukaryotischen 26S-Proteasoms [46]. Zunächst wurden die Arbeitslösungen für Bortezomib und DMSO (Carl Roth) in gleichen Volumenverhältnissen jeweils mit Medium hergestellt. Schließlich wurden die Zellen mit 1 μM Bortezomib-Lösung oder DMSO-Lösung für 2 und 6 Stunden inkubiert.

Neben dem Abbau der Proteine im Proteasom kann dieser Prozess auch in den Lysosomen erfolgen, einem Zellorganell mit saurem pH-Wert, das Verdauungsenzyme wie Proteasen, Lipasen und Nukleasen enthält. Hierdurch werden verschiedene Makromoleküle der Zelle oder zellfremde Bestandteile degradiert.

Die Leberkrebs-Zelllinie wurde hierfür nach einer 48 stündigen Statin-Präinkubation (2.7.11) mit verschiedenen Kombinationen lysosomaler Inhibitoren für 6 Stunden inkubiert. Die erste Mischung hat sich zusammengesetzt aus 200 μM Chloroquin-diphosphat (Sigma Aldrich), welches die lysosomale DNase hemmt, und 10 mM Ammoniumchlorid (Carl Roth), welches zur Neutralisation des pH-Wertes führt. Die zweite Kombination wurde noch zusätzlich mit 100 μM des Serin-, Cystein-Proteaseninhibitors Leupeptin (Leupeptin Hemisulfat; Carl Roth) versetzt [134, 135]. Die Anfertigung der Stammlösungen erfolgte mit doppelt destilliertem Wasser. Zur Herstellung der Arbeitslösungen wurden die drei Inhibitoren entsprechend ihrer Endkonzentration (Chloroquin-diphosphat: $c_{\text{AL}} = 10 \text{ mM}$; Ammoniumchlorid: $c_{\text{AL}} = 500 \text{ mM}$; Leupeptin: $c_{\text{AL}} = 1 \text{ mM}$) jeweils mit Medium angesetzt.

2.7.16 Transfektion humaner Zelllinien

Die Transfektion ist eine Methode zur Aufnahme von Nukleinsäuren wie DNA oder RNA in eukaryontische Zellen. Bei der in dieser Arbeit eingesetzten Form der Transfektion handelt es sich um die Lipofektion, welche unter Serum-freien Bedingungen stattfindet. Dies geschieht mit Hilfe kationischer Lipide, welche mit den negativ geladenen Nukleinsäuren Lipoplexe bilden und so schließlich eine Aufnahme in die Zelle über Endocytose erfolgen kann.

Die Transfektionsexperimente dieser Arbeit wurden mit dem Reagenz Lipofectamine® 2000 (Life Technologies) an adhärenenten Krebszelllinien durchgeführt. Abhängig von

nachfolgenden analytischen Experimenten, wie Western Blot (2.8.2) oder Dual-Luciferase-Assay (2.8.3), wurden am Vortag entweder $2,5 \cdot 10^5$ Skov3 Zellen in eine 12-Well Platte (Greiner Bio-One) oder $2 \cdot 10^4$ bis $3 \cdot 10^4$ HepG2 Zellen in eine 96-Well Platte (Greiner Bio-One) ausgesät.

Für die Transfektion von Skov3 Zellen in einer 12-Well Platte wurden zu Beginn 2 μ l Transfektionsreagenz und 98 μ l Opti-MEM I - GlutaMAXTM-I (Life Technologies) pro Reaktionsansatz eingesetzt. Diese Lösung 1 wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In Lösung 2 wurden pro Reaktionsansatz 500 ng der verschiedenen *Pim-1* cDNA Plasmid-DNA Konstrukte (2.5.1) gelöst und auf ein Endvolumen von 100 μ l mit Opti-MEM I - GlutaMAXTM-I aufgefüllt. Im Anschluss wurden beide Lösungen 1:1 gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Nährmedium gegen Opti-MEM I - GlutaMAXTM-I ausgetauscht. Danach wurden 200 μ l des Lösung 1/2- Gemisches zu jedem Well gegeben und der gesamte Transfektionsansatz für 4 bis 5 Stunden im Brutschrank inkubiert (CO₂ Air-Jacketed Incubator, NuAireTM). Abschließend wurde durch erneuten Mediumwechsel die Transfektion abgestoppt und ein Teil der Zellen mit Simvastatin (Sigma Aldrich) oder DMSO (Carl Roth) für 48 Stunden behandelt (2.7.11).

Für die Lösung 1 der Transfektion von HepG2 Zellen in einer 96-Well Platte wurden 0,2 μ l Lipofectamine[®] 2000 (Life Technologies) mit 4,8 μ l Opti-MEM I - GlutaMAXTM-I (Life Technologies) pro Reaktionsansatz gemischt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Zur Herstellung der Lösung 2 wurden 100 ng der verschiedenen pFR_HCV_xb-Plasmide (2.5.2) eingesetzt und auf ein Endvolumen von 5 μ l mit Opti-MEM I - GlutaMAXTM-I aufgefüllt. Beide Lösungen wurden 1:1 gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das IMDM Medium durch Opti-MEM I - GlutaMAXTM-I ersetzt und 10 μ l des Lösung 1/2- Gemisches zu jedem Well gegeben. Schließlich verblieb der gesamte Transfektionsansatz für 4 bis 5 Stunden auf den Zellen bei 37°C (CO₂ Air-Jacketed Incubator, NuAireTM). Nach Ablauf der Zeit wurde die Reaktion durch Zugabe des Nährmediums abgestoppt und ein Teil der Zellen mit Simvastatin (Sigma Aldrich) (2.7.11), Mevalonat (Sigma Aldrich) (2.7.12) oder DMSO (Carl Roth) für 48 Stunden behandelt.

2.8 Protein Techniken

2.8.1 SDS PAGE

SDS PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis) ist eine Methode zur Auftrennung denaturierter Proteine im elektrischen Feld. Das SDS dient als

Detergenz und bindet an die Aminosäuren des linearisierten Proteins. Dadurch lassen sich diese nun negativ geladenen Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse auftrennen. Aufgrund verschiedener pH-Bedingungen zwischen Sammel- und Trenngel kann eine gute Auflösung der Proteine erzielt werden [136]. Folgende Komponenten wurden zur Herstellung von SDS-Gelen eingesetzt.

Tabelle 5: Pipettierschema von Mini-SDS-Gelen

	Trenngel			Sammelgel
	10 %	12,5 %	15 %	4 %
4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,6 % SDS)	4 ml	4 ml	4 ml	-
4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,6 % SDS)	-	-	-	1,8 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	5,3 ml	6,6 ml	8 ml	1 ml
APS (10 %)	80 µl	80 µl	80 µl	24 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	9 µl
ddH ₂ O	6,7 ml	5,3 ml	4 ml	4,7 ml
Gesamtvolumen	16,1 ml	16 ml	16,1 ml	7,53 ml

Die zu analysierenden Proteinproben wurden zunächst in 60-100 µl Lysepuffer (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4 % SDS; 1,4 M β -Mercaptoethanol; 0,05 % Bromphenolblau) aufgenommen, kurz auf dem Vortexer (neoLab 7-2020) geschüttelt und für 5 min bei 95°C denaturiert (Biometra TB1 Thermoblock). Die Gelelektrophorese wurde im Bio-Rad Mini-PROTEAN® 3 Cell Mini-Gelsystem (Bio-Rad) mit 1x SDS-Laufpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris-HCl; 0,01 % SDS) bei 140-180 V durchgeführt bis das Bromphenolblau vollständig herausgelaufen ist (für 10 % und 15 % SDS-Gele) bzw. bis das Bromphenolblau das untere Ende der Glasplatte erreicht hat (für 12,5 % SDS-Gele).

2.8.2 Western Blot

Der Western Blot (WB) ist ein Immunblot, welcher zum Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf eine Trägermembran entwickelt wurde [137]. Die Proteine werden anschließend mit spezifischen Antikörpern inkubiert und mittels Chemolumineszenz visualisiert.

Für das Experiment wurden jeweils $2,5 \cdot 10^5$ Zellen der verschiedenen Krebszelllinien in einem Volumen von 2 ml Medium in einer 12-Well Platte ausgesät. Für einen Western Blot mit primären Zellen erfolgte die Aussaat von $3 \cdot 10^6$ Monozyten in einem Gesamtvolumen von 3 ml in einer 6-Well Platte.

Nach Beendigung der SDS PAGE (2.8.1) wurde das Gel in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl pH 8,3; 192 mM Glycin; 10 % Methanol) überführt und bis zum Aufbau des Blots darin aufbewahrt um die Proteine in der Gelmatrix zu fixieren. Als Vorbereitung wurde das Whatmann-Papier (Extra thick blot filter paper, Bio-Rad) ebenfalls mit Transferpuffer inkubiert. Die Aktivierung der Immobilon[®]-P PVDF Membran (Merck Millipore) erfolgte durch Inkubation in Methanol für 15 sek. Anschließend wurde die Membran für 2 min mit Wasser gewaschen und dann ebenso in Transferpuffer überführt. Der Proteintransfer erfolgte mit Hilfe des Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) bei 10 V für 33 bis 45 min, abhängig von der Größe der zu blottenden Proteine. Im Anschluss daran wurde die Membran für 2 Stunden mit 5 % Milchpulver oder einem Gemisch aus 5 % Milchpulver und 5 % BSA, gelöst in 1x TBST (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20), blockiert um Protein-freie Bereiche der Membran aufzufüllen. Dann wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit einem spezifischen Erstantikörper (Tabelle 1) behandelt, woraufhin am nächsten Tag die Inkubation mit dem Zweitantikörper (Tabelle 2) erfolgte. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde die Membran jeweils 4 Mal mit 1x TBST gewaschen. Durch Überschichtung der Membran mit Western Lightning[®] Plus ECL Lösung (PerkinElmer) oder SignalFire[™] ECL Reagent (Cell Signaling) für jeweils 2 min oder 1 min erfolgte die Umsetzung dieses Substrates durch die am 2. Antikörper gebundenen Horseradish Peroxidase (HRP). Zur Detektion der Proteine mittels Chemolumineszenz wurden jeweils Carestream[®] Kodak[®] BioMax[®] light Film, Carestream[®] Kodak[®] autoradiography GBX Entwickler und Fixierer (Kodak) verwendet. Hierbei war die Expositionsdauer des Films abhängig von dem zu analysierenden Protein und dem ECL Reagenz. Alternativ wurde das ChemiDoc[™] Imaging System der Firma Bio-Rad zur Protein-Detektion eingesetzt.

Zur Detektion der Ladekontrolle (β -Aktin) wurde die Membran für 30 min bei 50°C mit Stripping-Lösung (62,5 mM Tris-HCl pH 6,7; 100 mM β -Mercaptoethanol; 2 % SDS) im Hybridisierungsofen inkubiert (Biometra OV3) und anschließend, wie oben beschrieben, mit 5 % Milchpulverlösung blockiert. Die Behandlung der Membran mit dem Erst- und Zweitantikörper erfolgte in einem Schritt.

2.8.3 Dual-Luciferase Reporter Assay

Der Luciferase Reporter Assay ist eine Methode zur Untersuchung der Genexpression auf transkriptioneller oder translationeller Ebene. Das Prinzip beruht auf der Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin mit Hilfe des Luciferase-Enzyms wobei es zur Lichtreaktion (Chemilumineszenz) kommt. Der Dual-Luciferase Reporter Assay bedient sich zweier verschiedener Luciferasen, der Firefly- und der Renilla-Luciferase, wobei Letzteres als Transfektionskontrolle dient [138-140].

Für das Experiment wurden $2 \cdot 10^4$ bis $3 \cdot 10^4$ HepG2 Zellen in einer 96-Well Platte mit jeweils 100 ng der verschiedenen pFR_HCV_xb Plasmide (2.5.2) transfiziert (2.7.16) und anschließend mit 10 μ M Simvastatin (Sigma Aldrich) (2.7.11), 10 μ M Mevalonat (Sigma Aldrich) (2.7.12) oder DMSO (Carl Roth) in einem Gesamtvolumen von 200 μ l Medium behandelt. Nach 48 Stunden wurde der Dual-Luciferase Assay entsprechend dem Herstellerprotokoll (Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System, Promega, E1960) durchgeführt. Die Lumineszenz-Messung erfolgte mittels der XFlour4 Software am Safire^{2™} Mikroplatten-Lesegerät (Tecan). Hierbei wurden folgende Messparameter für den Dual-Luciferase-Assay gewählt: Messmodus: Lumineszenz; Integrationszeit: 1000 msec; Schütteldauer: 5 sek; Temperatur: 25°C; Platte: GRE96fb. Die Messung der Firefly-Luciferase und der Renilla-Luciferase wurde gleichermaßen durchgeführt.

Zur Auswertung der Daten wurden zunächst die ermittelten Werte der Firefly-Luciferase durch die der Renilla-Luciferase dividiert. Anschließend wurde dieser Wert durch den Mittelwert der Negativkontrolle (pFR_HCV_xb leer-HSV Promotor) (2.5.2.1) geteilt und somit das Hintergrundsignal der Firefly-Luciferase herausgerechnet.

2.9 Allgemeine Nukleinsäure-Techniken

Nukleinsäure-Techniken können für DNA und RNA eingesetzt werden. DNA und RNA Proben wurden in doppelt destillierten Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

2.9.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Durch den aromatischen Ring der Base sind Nukleinsäuren in der Lage ultraviolettes Licht bei 260 nm zu absorbieren. Diese Wellenlänge stellt deren spezifisches Absorptionsmaximum dar. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am UV/VIS-Spektrometer BioMate 3 (Thermo Spectronic) oder UV5Nano-Spektrometer (Mettler Toledo) nach dem Prinzip des Lambert-Beerschen-Gesetzes (Gleichung 2). Dieses beschreibt die Intensitätsabschwächung einer Strahlung durch die im Medium

absorbierende Substanz, in Abhängigkeit von der Konzentration der absorbierenden Substanz und der Pfadlänge des Lichtstrahls.

Gleichung 2:

$$A_{\lambda} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

[A_{λ}]: Absorption einer bestimmten Wellenlänge des Lichtes (λ)

[ε]: molarer Absorptionskoeffizient ($\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$)

[c]: molare Konzentration ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

[d]: Pfadlänge des Lichtstrahls durch die Probe (m)

Für die Bestimmung der Konzentration am UV/VIS-Spektrometer BioMate 3 wurde 1 μl der zu analysierenden Probe mit 99 μl doppelt destillierten Wasser verdünnt und in einer Quarzküvette (10 mm, Hellma) gemessen. Zur Konzentrationsbestimmung am Nano5-Spektrometer wurden 1-2 μl der unverdünnten Probe auf die Messfläche gegeben.

Bei einer Absorption von 1 und einer optischen Pfadlänge von 1cm ergeben sich folgende Konzentrationen von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm.

1 A_{260} dsDNA entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$

1 A_{260} ssDNA entspricht 37 $\mu\text{g/ml}$

1 A_{260} RNA entspricht 40 $\mu\text{g/ml}$

Zur Ermittlung der Reinheit von Nukleinsäure-Proben kann das Verhältnis $A_{260/280}$ herangezogen werden, da die aromatischen Aminosäuren Licht bei 280 nm absorbieren. Lösungen, die keine Protein- oder phenolische Verunreinigungen aufweisen, besitzen ein $A_{260/280}$ Verhältnis von ungefähr 1,8 für DNA und ca. 2,0 für RNA [121].

2.9.2 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese stellt eine analytische Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuren (2.9.2.1) oder Proteinen (2.8.1) in einem elektrischen Feld dar. Dabei wandern die einzelnen Moleküle in Abhängigkeit von ihrer Größe, Struktur und Ladung. Dies findet in einer Gelmatrix statt. Je nach Anwendung handelt es sich hierbei um Polyacrylamid oder Agarose, das als Trägermedium dient. Dieses kann verschiedene Porengrößen aufweisen, welche wiederum die Geschwindigkeit der Molekültrennung beeinflusst.

2.9.2.1 Agarosegelelektrophorese

1965 wurde die Auftrennung von Nukleinsäuren in einem Agarosegel von R. Tsanev erstmals beschrieben [141]. Dabei wandern die negativ geladene DNA- oder RNA-Oligonukleotide im elektrischen Feld zur Anode, ermöglicht durch deren Phosphat-Rückgrat. Hierbei steht die Ladung im direkten Verhältnis zur Menge an Phosphat-Gruppen der Nukleinsäurekette.

Im Verlauf dieser Arbeit kam die Agarosegelelektrophorese zur Analyse von DNA-Plasmiden und PCR-Reaktionen zur Anwendung. Abhängig von der Größe des zu untersuchenden DNA-Moleküls wurde 0,4-2,0 % Agarose in 1x TBE-Puffer (89 mM Tris-HCl; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA) aufgenommen und in der Mikrowelle erhitzt um die Agarose zu lösen. Dabei gilt, je größer das DNA-Fragment, desto niedriger ist die verwendete Agarosemenge. Für eine spätere Detektion der Nukleinsäuren wurden nach kurzem Abkühlen der Agarose-TBE-Lösung noch 2-3 µl GelRed™ (10,000x; Biotium) hinzugefügt. Dieser fluoreszierende Farbstoff ist in der Lage in doppelsträngige DNA zu interkalieren. Anschließend wurde alles in eine entsprechende Gelkammer (BioRad) der Gießvorrichtung gegeben und der Kamm (BioRad) für die Geltaschen eingesetzt. Nach der Polymerisation der Agarose wurde die Gelkammer in eine Laufkammer (BioRad) eingesetzt und diese mit 1x TBE-Laufpuffer bis zur Markierung befüllt. Zum Beladen des Agarosegels wurden die DNA-Proben mit 5x DNA-Ladepuffer (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM EDTA pH 8,0; 70 % Glycerin (v/v); 0,05 % Bromphenolblau (w/v); 0,05 % Xylencyanolblau (w/v)) auf eine 1x Lösung verdünnt. Standardmäßig wurden ebenfalls 5 µl DNA-Marker (Tabelle 3) zur Größenanalyse der DNA-Moleküle aufgetragen. Danach liefen die Gele bei einer maximalen Spannung von 9-12 V/cm. Abschließend wurden die Nukleinsäuren nach Beendigung des Gellaufs in einer Geldokumentation (Dark Hood DH-5; Biostep®) mittels ultravioletten Licht dargestellt.

2.10 RNA Techniken

2.10.1 RNA-Präparation

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus humanen Zellen für eine anschließende cDNA-Synthese und qPCR wurde das Nucleospin® miRNA Isolationskit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Gemäß des Herstellerprotokolls 6.1 S+L konnten sowohl kleine RNAs und mRNAs als auch das Gesamtprotein einer Probe aufgereinigt werden. Der DNase-Verdau der Proben erfolgte jeweils für mindestens 1 Stunde. Am Ende wurde die RNA in 40 µl doppelt destilliertes, auf 90°C vorgewärmtes, RNase-freies Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.11 DNA Techniken

2.11.1 Plasmid Präparation

Zu Beginn wurden die DH5 α Zellen der 3-5 ml Übernachtskulturen bei 3000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Hierfür wurde zur Isolierung der Plasmid-DNA entsprechend dem GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit Herstellerprotokoll (Thermo Scientific™) vorgegangen. Für größere Bakterienkulturansätze (200 ml) wurden zunächst die transformierten DH5 α Zellen bei 4000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert und anschließend die Plasmid-DNA nach 7.2 des Herstellerprotokolls (NucleoBond® PC 100 Plasmid Purification Kit; Macherey-Nagel) isoliert. Die aufgereinigte DNA wurde schließlich in doppelt destilliertem Wasser aufgenommen und die Konzentration (2.9.1) bestimmt.

2.11.2 Isolierung genomischer DNA aus Humanzellen

Die genomische DNA (gDNA) von HeLa Zellen wurde isoliert zur Klonierung der Pim-1 STAT3 BS Promotor-Konstrukte. Hierfür wurde das DNeasy® Blood & Tissue Kit der Firma Quiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte mittels Säulen nach dem Protokoll „Aufreinigung von Gesamt-DNA aus tierischen Blut oder Zellen“ entsprechend den Herstellerangaben. Für die Präparation wurden $8 \cdot 10^6$ Zellen eingesetzt. Nach der Elution der Gesamt-DNA mit doppelt destilliertem Wasser wurde die Konzentration am Nano5-Spektrometer (Mettler Toledo) bestimmt (2.9.1) um sie anschließend in einer PCR einzusetzen (2.11.10.1).

2.11.3 5'-OH-Phosphorylierung von DNA

Zur Phosphorylierung des PCR-Produktes wurde die T4 Polynukleotidkinase (T4 PNK) von Thermo Scientific™ verwendet. Dieses Enzym besitzt eine 5'-Hydroxyl-Kinaseaktivität wodurch eine Phosphatgruppe von ATP auf das freie 5'-OH-Ende von DNA-Molekülen übertragen werden kann. Für die Reaktion wurde folgender Ansatz (Tabelle 6) verwendet.

Tabelle 6: Phosphorylierung von DNA-Molekülen

Komponente	Konzentration	Einsatzmenge
PCR-Produkt	-	10µl
Reaktionspuffer A	10x	2 µl
ATP	10 mM	2 µl
T4 PNK	10 U/µl	1 µl
ddH ₂ O	-	aufgefüllt auf 20 µl
Phosphorylierung für 25 min bei 37°C Inaktivierung für 10 min bei 75°C		

2.11.4 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, welche doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen, auch Restriktionsschnittstellen genannt, schneiden. Diese Erkennungssequenzen sind 4-8 Nukleotide lang und weisen ein palindromisches Sequenzmotiv auf. Restriktionsendonukleasen sind vornehmlich in Bakterien und Archeen zu finden und konnten in den 1970 Jahren isoliert werden [142, 143]. Es gibt vier Typen von Restriktionsenzymen. Allerdings kommen in der Molekularbiologie hauptsächlich Restriktionsenzyme des Typs II zum Einsatz. Sie schneiden die doppelsträngige DNA entweder versetzt, wodurch sich sogenannte klebrige Enden bilden oder sie schneiden die DNA an gleicher Position, sodass glatte Enden entstehen. Folgende, in der Tabelle 7 angegebenen, Restriktionsenzyme (Thermo Scientific™) wurden für die Klonierung verwendet.

Tabelle 7: verwendete Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz 5' → 3'
FastDigest <i>Bam</i> HI	G↓GATCC
FastDigest <i>Bg</i> II	A↓GATCT
FastDigest <i>Eco</i> RI	G↓AATTC
FastDigest <i>Hind</i> III	A↓AGCTT

Zur Klonierung des HSV TK negativen-Promotor-Konstruktes wurden für den Restriktionsverdau 2 µg des pFR_HCV_xb Leerplasmides eingesetzt. Der Kontrollverdau wurde mit 300 ng Plasmid-DNA durchgeführt. Der Restriktionsverdau erfolgte jeweils entsprechend den Herstellerangaben (Thermo Scientific™). Im Anschluss daran wurden die Proben zur Analyse auf ein Agarosegel geladen und mit GelRed™ angefärbt (2.9.2.1). Zur weiteren Verwendung wurde das DNA-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (2.11.11).

2.11.5 DpnI-Verdau von Plasmid-DNA

Da sich nach einer PCR-Reaktion noch Template-DNA in der Probe befindet, wird diese mit Hilfe des Enzyms *DpnI* für weitere Klonierungsschritte abgebaut. Diese Endonuklease ist in der Lage methylierte DNA zu verdauen, welche zuvor in Bakterien überexprimiert wurde.

Für den *DpnI*-Verdau wurden 10 µl des PCR-Ansatzes verwendet. Das Enzym (*DpnI* oder FastDigest *DpnI*) wurde von Thermo Scientific™ bezogen und jeweils nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.11.6 Klenow-Fragment

Bei dem Klenow-Fragment (Thermo Scientific™) handelt es sich um das große Fragment der DNA-Polymerase I von *E.coli*. Das Enzym besitzt eine 5'→3' Polymeraseaktivität und eine 3'→5' Exonukleaseaktivität, jedoch keine 5'→3' Exonukleaseaktivität. Mit Hilfe dieses Enzyms wurden die nach einem Restriktionsverdau entstandenen klebrigen Enden des linearisierten Plasmides am 3'-Ende abgebaut und am 5'-Ende mit Nucleotiden aufgefüllt, sodass glatte Enden entstehen. Die Reaktion erfolgte nach folgenden angeführten Bedingungen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Ansatz für Klenow-Fragment Reaktion

Komponente	Konzentration	Einsatzmenge
linearisierte Plasmid-DNA	107,3 ng/μl	10 μl
Puffer Klenow-Fragment	10x	2 μl
dNTPs	2mM pro Nukleotid	0,5 μl
Klenow-Fragment	10 U/μl	0,5 μl
ddH ₂ O	-	aufgefüllt auf 20 μl
Inkubation für 20 min bei 37°C Inaktivierung für 10 min bei 75°C		

2.11.7 Ligation von Plasmid-DNA

Die Ligation ist ein zentraler Schritt bei der Klonierung von Plasmid-DNA. Hierbei werden das freie 3'-Hydroxy-Ende und das freie 5'-Phosphat-Ende der Nukleinsäuren mit Hilfe der Ligase, durch Bildung einer Phosphodiesterbindung, verknüpft.

Bei der Ligation des pFR_HCV_xb leer-HSV Promotor-Konstruktes und des pFR-HCV_xb+Pim-1 STAT3 BS mut2 Konstruktes handelt es sich um eine Verknüpfung glatter Enden. Der Ligationsansatz für beide Plasmid-Konstrukte wurde wie in den Tabellen 9 und 10 beschrieben, durchgeführt. Das Enzym und die entsprechenden Puffer wurden von der Firma Thermo Scientific™ bezogen.

Tabelle 9: Ligationsansatz des pFR_HCV_xb leer-HSV Promotor Plasmid-Konstruktes

Komponente	Konzentration	Einsatzmenge
Plasmid-DNA (pFR_HCV_xb leer-HSV Promotor)	40 ng	0,4 μl
T4 DNA Ligase-Puffer	10x	5 μl
PEG 4000	50 %	2,5 μl
T4 DNA Ligase	5 U/μl	1 μl
ddH ₂ O	-	aufgefüllt auf 50μl
Ligation über Nacht bei RT		

Tabelle 10: Ligationsansatz des pFR_HCV_xb+Pim-1 STAT3 BS mut2 Plasmid-Konstruktes

Komponente	Konzentration	Einsatzmenge
<i>DpnI</i> -Verdau der Plasmid-DNA (pFR_HCV_xb+Pim-1 STAT3 BS mut2)	-	10 µl
T4 DNA Ligase-Puffer	10x	2 µl
T4 DNA Ligase	5 U/µl	4 µl
ddH ₂ O	-	aufgefüllt auf 20µl
Ligation über Nacht bei RT		

2.11.8 Gibson-Assembly

Beim Gibson Assembly handelt es sich um eine Exonuklease-basierte Methode zur nahtlosen Assemblierung von DNA-Molekülen in korrekter Reihenfolge. Die Reaktion läuft unter isothermalen Bedingungen ab, wobei die 5'-Exonuklease, DNA-Polymerase und DNA-Ligase zum Einsatz kommen. Durch die T5-Exonuklease werden die 5'-Enden des DNA-Doppelstranges partiell verdaut. Anschließend füllt die DNA-Polymerase die Lücken der annealenden Einzelstrang-Bereiche auf, sodass die DNA-Ligase die freien Enden des nun doppelsträngigen Abschnittes verknüpfen kann [144].

Nach der Amplifikation des pFR_HCV_xb Leerplasmides und des *Pim-1* Promotors aus der genomischen DNA von HeLa Zellen mit den jeweils ca. 20 Nukleotid langen, komplementären Überhängen, erfolgte das Zusammenfügen beider DNA-Fragmente mittels des Gibson Assembly Mastermixes (New England BioLabs). Hierfür wurden 78,77 ng (0,02 pmol) des amplifizierten Vektors verwendet. Zur Erhöhung der Klonierungseffizienz wurden 201,1 ng (0,22 pmol) des *Pim-1* Promotor-Fragmentes eingesetzt um einen 2,5-fachen Überschuss zu erreichen. Entsprechend den Herstellerangaben wurde die Reaktion, wie in Tabelle 11 beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 11: Gibson Assembly Reaktionsansatz

Komponente	Konzentration	Einsatzmenge
Vektor-DNA und Insert	279,87 ng (0,24 pmol)	3,2 µl
Gibson Assembly Mastermix	2x	10 µl
ddH ₂ O	-	aufgefüllt auf 20 µl
Inkubation für 15 min bei 50°C		

Im Anschluss an das Gibson Assembly erfolgte die Transformation (2.6.5) einer 1:4 Verdünnung des gesamten Ansatzes des pFR_HCV_xb+Pim-1 STAT3 BS WT Konstruktes in DH5α Zellen.

2.11.9 Reverse Transkription

Die reverse Transkription (RT) ist eine Methode zur Gewinnung von komplementärer DNA (cDNA) aus einem RNA-Template. Katalysiert wird diese Reaktion von einem einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase. Ursprünglich wurde dieses Enzym in Retroviren entdeckt [145, 146], welche die Reverse Transkriptase zur Replikation ihres Einzel(+)-strängigem RNA-Genoms benötigen. Seither findet diese Methode Einsatz in der Molekularbiologie bei der Durchführung von PCRs aus RNA generierter cDNA.

In dieser Arbeit wurde zur cDNA-Synthese die RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific™) eingesetzt. Aufgrund einer Punktmutation in der Sequenz weist dieses Enzym keine RNase H-Aktivität mehr auf. Dadurch kann die Template-RNA nicht abgebaut werden und erhöht somit die Menge an Vollängen-cDNA. Weiterhin wurden für die reverse Transkription von mRNA-Molekülen (*messengerRNA*) Random Hexamer-Primer (Thermo Scientific™) verwendet. Schließlich erfolgte die Durchführung der cDNA-Synthese (Tabelle 12) entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls (Thermo Scientific™).

Tabelle 12: Reverse Transkription

Komponente	Konzentration	Einsatzmenge (+) RT-Probe	Einsatzmenge (-) RT-Probe
RNA	-	0,5-1 µg	0,5-1 µg
Random Hexamer-Primer	10 µM	2 µl	2 µl
ddH ₂ O	-	aufgefüllt auf 13 µl	aufgefüllt auf 14 µl
Inkubation für 5 min bei 65°C Zugabe des RT-Mastermixes bei 25°C			
RT-Puffer	5x	4 µl	4 µl
dNTPs	10 mM (2,5 mM pro Nukleotid)	2 µl	2 µl
RevertAid H Minus Reverse Transkriptase	200 U/µl	1 µl	-
Inkubation für 10 min bei 25°C cDNA-Synthese: 60 min bei 42°C Inaktivierung: 10 min bei 70°C			

Die cDNA-Proben wurden für die Verwendung in der qPCR (quantitative Echtzeit-PCR) mit doppelt destilliertem Wasser verdünnt. Bei einer Ausgangsmenge von 0,5 µg RNA wurde die cDNA im Verhältnis 1:0,75 mit Wasser gemischt. Wurde 1 µg RNA eingesetzt, so erfolgte eine Verdünnung von 1:1,5 der cDNA mit Wasser. Die Proben wurden dann bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.11.10 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR, wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt [147]. Es handelt sich hierbei um eine häufig eingesetzte molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren mit Hilfe der DNA-abhängigen DNA-Polymerase. Dieses Enzym katalysiert in 5'-3' Richtung die Synthese von DNA-Einzelsträngen, welche komplementär zum DNA-Matrizenstrang sind. Hierfür werden kurze Oligonukleotide, sogenannte Primer, benötigt um am freien 3'-OH-Ende des Matrizenstranges die Neusynthese beginnen zu können. Ein Vorteil dieser Methode ist die geringe Menge an Ausgangsmaterial, dem Template, die für die PCR eingesetzt werden muss, da jeder neu synthetisierte DNA-Strang wiederum als Vorlage genutzt werden kann.

2.11.10.1 Amplifizierung genomischer DNA

Zur Klonierung des Pim-1 STAT3 BS Wildtyp Promotor-Konstruktes wurde der *Pim-1* Promotor aus aufgereinigter genomischer DNA (gDNA) (2.11.2) aus Hela Zellen amplifiziert. Die dafür verwendeten Primer (Tabelle 21: pFR+Pim-1-Stat3Ffor, pFR+Pim-1-Stat3Frev) besitzen je einen identischen Bereich sowohl zur Sequenz des Vektors als auch zur Sequenz des Inserts. Dabei ist das 3'-Ende des Primers für das Annealing verantwortlich. Für die PCR-Reaktion wurde folgender Ansatz (Tabelle 13) pipettiert. Die Amplifikation der genomischen DNA erfolgte in einem PCR-Cycler der Firma Biometra (T1 Thermocycler) und ist unter den aufgeführten Bedingungen in Tabelle 14 abgelaufen.

Tabelle 13: PCR-Reaktionsansatz der gDNA

Komponente	Konzentration	Einsatzmenge
gDNA	10 ng	1 µl
GC-Puffer (Kapa Biosystems)	5x	5 µl
dNTPs	10 mM pro Nukleotid	0,75 µl
pFR+Pim-1-Stat3Ffor	10 µM	0,75 µl
pFR+Pim-1-Stat3Frev	10 µM	0,75 µl
KAPAHiFi DNA Polymerase (Kapa Biosystems)	1 U/µl	0,5 µl
ddH ₂ O	-	aufgefüllt auf 25 µl

Tabelle 14: PCR-Programm der gDNA

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Denaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	98°C	20 sek	25
Annealing	60-70°C (Gradient in 12 Schritten)	15 sek	
Elongation	72°C	90 sek	
Elongation	72°C	5 min	1

2.11.10.2 Amplifizierung des pFR_HCV_xb Plasmides

Für die Klonierung der Pim-1 STAT3 BS Promotor-Konstrukte erfolgte die Amplifizierung des Plasmidbackbones pFR_HCV_xb mit Hilfe der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). Die hierfür eingesetzten Primer (Tabelle 17) besitzen, ebenso wie die für die Amplifizierung der genomischen DNA, je einen identischen Bereich zur Vektorsequenz und zur Sequenz des Inserts. Das 3'-Ende des Primers hybridisiert mit der Template-DNA. Der für die PCR verwendete Ansatz ist in Tabelle 15 angeführt, sowie folgendes PCR-Programm in Tabelle 16.

Tabelle 15: PCR-Reaktionsansatz der pFR_HCV_xb Amplifizierung

Komponente	Konzentration	Einsatzmenge
Plasmid-DNA	5 ng	0,42 µl
Phusion HF Mastermix	2x	25 µl
pFR+Pim-1-Stat3Vfor	100 µM	0,25 µl
pFR+Pim-1-Stat3Vrev	100 µM	0,25 µl
ddH ₂ O	-	aufgefüllt auf 50 µl

Tabelle 16: PCR-Programm der pFR_HCV_xb Amplifizierung

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Denaturierung	98°C	30 sek	1
Denaturierung	98°C	5 sek	30
Elongation	72°C	92 sek	
Elongation	72°C	10 min	1

Tabelle 17: verwendete Primer der pFR_HCV_xb Amplifizierung

Plasmid	Primer-Name	Primer-Sequenz 5'→ 3'	Produktlänge
pFR_HCV_xb	pFR+Pim-1-Stat3Vfor	5' aca tcc tgg agg ttg gga tgG AAG ACG CCA AAA ACA TAA AGA AAG	5318 bp
	pFR+Pim-1-Stat3Vrev	5' atc ctg att tct ggg aag ggT AGA TCT GTC GAG CCA TGT GAG CAA AAG	

Plasmid/Vektor-Sequenz ist in Großbuchstaben dargestellt, Insert/Fragment-Sequenz ist in Kleinbuchstaben abgebildet

2.11.10.3 *In vitro* Mutagenese

Die *in vitro* Mutagenese des Pim-1 STAT3 BS mut Promotor-Konstrukte erfolgte nach dem Prinzip des Quik Change® XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). Die verwendeten Primer sind vollständig komplementär zueinander, da sie an der gleichen Stelle des Templates hybridisieren. Hierbei liegt der Bereich, der mutiert werden soll, in der Mitte der Primer. Als Template wurden 5 ng des pFR_HCV_xb+Pim-1 STAT3 BS WT Plasmides für die PCR eingesetzt.

Zur Klonierung des Pim-1 STAT3 BS mut2 Promotor-Konstruktes wurde eine *in vitro* Mutagenese nach dem Prinzip der Site-Directed-Mutagenesis durch inverse PCR (Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit, New England BioLabs) durchgeführt. Die Substitution erfolgte mit Hilfe des *forward*-Primers, wobei die Mutation wieder mittig des Primers gelegen ist. Das 5'-Ende des *reverse*-Primers ist Rücken-an-Rücken an das des *forward*-Primers aneinander gelagert. Als Ausgangsplasmid wurden 3,9 ng des Pim-1 STAT3 BS mut Promotor-Konstruktes für die PCR verwendet.

Die PCR beider Mutanten-Konstrukte wurde mittels der KAPAHiFi DNA-Polymerase (Kapa Biosystems) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Das jeweilige PCR-Programm zur Amplifizierung beider Mutanten ist in den Tabellen 18 und 19 dargestellt. Die Schmelztemperatur der verwendeten Primer (Tabelle 20) wurde mit Hilfe der Software SnapGene (2.12.4) ermittelt um im Anschluss die Annealingtemperatur für die PCR bestimmen zu können. Hierfür wurde die nachstehende Gleichung angewendet (Gleichung 3, Agilent Technologies).

Gleichung 3:

$$T_A = T_M + \frac{GC\text{-Gehalt}}{N} - \frac{675}{N} - \frac{\text{Anzahl der annealenden Nukleotide}}{N}$$

[T_A]: Annealingtemperatur

[T_M]: Schmelztemperatur

[N]: Gesamtanzahl der Nukleotide

Tabelle 18: PCR-Programm des pFR_HCV_xb+ Pim-1 STAT3 BS mut Plasmides

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Denaturierung	98°C	3 min	1
Denaturierung	98°C	20 sek	25
Annealing	68°C	15 sek	
Elongation	72°C	7 min	
Elongation	72°C	5 min	1

Tabelle 19: PCR-Programm des pFR_HCV_xb+ Pim-1 STAT3 BS mut2 Plasmides

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Denaturierung	98°C	3 min	1
Denaturierung	98°C	20 sek	25
Annealing	62-70°C (Gradient in 12 Schritten)	15 sek	
Elongation	72°C	7 min	
Elongation	72°C	5 min	1

Tabelle 20: verwendete Primer für die *in vitro* Mutagenese

Plasmid	Primer-Name	Primer-Sequenz 5'→ 3'	Produktlänge
pFR_HCV_xb+Pim-1 STAT3 BS mut	pFR+Pim-1-Stat3MutBS for	5' CAT GGC TCG ACA GAT CTA tac cta cca cca gtc agg att cgc tgg tg	6633 bp
	pFR+Pim-1-Stat3MutBS rev	5' cac cag cga atc ctg act ggt ggt agg taT AGA TCT GTC GAG CCA TG	
pFR_HCV_xb+Pim-1 STAT3 BS mut2	pFR+Pim-1-Stat3BSmut2for	5' CAT GGC TCG ACA GAT CTA tac cca aat cgt gtc agg att cgc tgg tg	6633 bp
	Pim-1Stat3BSmut2rev2	5' TGA GCA AAA GGC CAG CAA AAG GCC	

Plasmid/Vektor-Sequenz ist in Großbuchstaben dargestellt, Insert/Fragment-Sequenz ist in Kleinbuchstaben abgebildet

2.11.10.4 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung der klonierten Plasmid-DNA auf ihre Korrektheit, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dafür wurden mehrere Kolonien von einer LB-Agarplatte gepickt und kurz in einen PCR-Ansatz getaucht. Die restliche Kolonie wurde in eine Übernachtskultur gegeben um am darauffolgenden Tag die Plasmid-DNA isolieren (2.11.1) zu können. Die Kolonie-PCR der Pim-1-STAT3 (BS) Promotor-Konstrukte wurde mit der KAPAHiFi DNA Polymerase (Kapa Biosystems) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die dafür eingesetzten Primer und deren Sequenzen sind in Tabelle 21 aufgelistet.

Tabelle 21: verwendete Primer für die Kolonie-PCR

Plasmid	Primer-Name	Primer-Sequenz 5'→ 3'	Produktlänge
pFR_HCV_xb+Pim-1 STAT3 BS WT	pFR+Pim-1-Stat3Ffor	5' CAC ATG GCT CGA CAG ATC TAc cct tcc cag aaa tca gga ttc g	1397 bp
	pFR+Pim-1-Stat3Frev	5' TTT ATG TTT TTG GCG TCT TCc atc cca acc tcc agg atg tcg	
pFR_HCV_xb+Pim-1 STAT3 BS mut	Seqfor-pFR+Pim-1Stat3	5' GTC GAT TTT TGT GAT GCT CG	1506 bp
	Seqrev-pFR+Pim-1Stat3	5' CCG GGC CTT TCT TTA TGT TT	
pFR_HCV_xb+Pim-1 STAT3 BS mut2	Seqfor-pFR+Pim-1Stat3	5' GTC GAT TTT TGT GAT GCT CG	1506 bp
	Seqrev-pFR+Pim-1Stat3	5' CCG GGC CTT TCT TTA TGT TT	

Plasmid/Vektor-Sequenz ist in Großbuchstaben dargestellt, Insert/Fragment-Sequenz ist in Kleinbuchstaben abgebildet

2.11.10.5 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR. Allerdings erfolgt neben der Vervielfältigung auch eine Quantifizierung von Nukleinsäuren. Diese Messung geschieht nach jedem PCR-Zyklus mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I (Thermo Scientific™), welcher in der kleinen Furche der amplifizierten doppelsträngigen DNA bindet. Da mit zunehmender Zyklenzahl auch die Fluoreszenz ansteigt, wird der PCR-Zyklus ermittelt, bei dem sich die Fluoreszenz erstmals deutlich vom Hintergrund unterscheidet. Dieser sogenannte C_T -Wert (*threshold-cycle*) wurde später zur Auswertung der PCR herangezogen.

Für das qPCR Experiment wurden jeweils $2,5 \cdot 10^5$ Zellen der verschiedenen Krebszelllinien in einer 12-Well Platte in einem Gesamtvolumen von 2 ml Medium beziehungsweise $3 \cdot 10^6$ Monozyten in einem Volumen von 3 ml Medium in einer 6-Well Platte ausgesät.

Die Messung erfolgte mit Hilfe des MyiQ™5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) oder Quant Studio 3 (Thermo Scientific™). Zur Amplifizierung der cDNA (2.11.10.5) der verschiedenen Zelllinien wurde der Absolute SYBR Green I capillary mix der Firma Thermo Scientific™ benutzt, welcher neben dem Fluoreszenzfarbstoff, auch die DNA-Polymerase, dNTPs und Puffersalze enthält. Die für die PCR eingesetzten Primer sind

in Tabelle 22 aufgelistet. Die PCR-Reaktion wurde, wie in Tabelle 23 aufgeführt, angesetzt. Das entsprechende PCR-Programm ist in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 22: qPCR-DNA-Primer

RNA Transkript	Primer-Name	Primer-Sequenz 5'→ 3'	Produktlänge
<i>Pim-1</i>	qPCR <i>Pim-1</i> fwd	5' ATC AGG GGC CAG GTT TTC T	73 bp
	qPCR <i>Pim-1</i> rev	5' GGG CCA AGC ACC ATC TAA T	
<i>β-Aktin</i>	qPCR <i>β-Aktin</i> fwd	5' CCA ACC GCG AGA AGA TGA	97 bp
	qPCR <i>β-Aktin</i> rev	5' CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG	

Tabelle 23: qPCR-Reaktionsansatz für mRNA

Komponente	Konzentration	Einsatzmenge
cDNA	1:1,5 oder 1:0,75 Verdünnung	5 µl
Absolut SYBR Green I capillary mix	2x	10 µl
Primer fwd	100 µM	0,1 µl
Primer rev	100 µM	0,1 µl
ddH ₂ O	-	4,8 µl

Tabelle 24: qPCR-Programm für mRNA

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95°C	15 min	1
Amplifizierung	95°C	10 sek	55
	55°C	10 sek	
	72°C	10 sek	
Schmelzkurve	65°C → 95°C	15 sek	1°C pro sek

Die Analyse der qPCR-Daten wurde mit Hilfe der iQTM5 Software (Version 2.0) von Bio-Rad oder der QuantStudioTM Design & Analysis Software (Version 1.4.2) von Thermo

Scientific™ durchgeführt. Damit konnten die 2^{-CT} -, $2^{-\Delta CT}$ - und $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte, unter Berücksichtigung von β -Aktin als internen Standard, zur quantitativen Auswertung der mRNA Level nach Schmittgen und Livak [148] ermittelt werden. Zunächst erfolgte die Bestimmung der ΔCT -Werte, indem der CT-Wert des internen Standards von dem des *Pim-1* subtrahiert wurde. Von diesem Wert der Statin-Probe wurde anschließend der ΔCT -Werte der DMSO-Kontrolle abgezogen und so der $\Delta\Delta CT$ -Wert erhalten. Weiterhin erfolgte die Berechnung der Datenabweichungen mittels SEM (*standard error of the mean*) und die Bestimmung der Genexpression bezüglich ihrer Signifikanz mit Hilfe des *Student's t-test* (Zweistichproben-t-Test, einseitig, gepaart). Zur Berechnung der P-Werte wurden die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte herangezogen.

2.11.11 Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach PCR und Restriktionsverdau

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte zur Entfernung kleinerer Oligonukleotide aus dem PCR-Ansatz (2.11.10). Die Elution von PCR-Reaktionen oder eines Restriktionsverdaus (2.11.4) wurden nach Auftrennung in einem Agarosegel (2.9.2.1) zur Isolierung des korrekten DNA-Fragmentes durchgeführt. Hierfür wurde das Wizard® SV Gel and Clean-Up System von Promega eingesetzt. Dies erfolgte jeweils nach Angaben des Herstellers. Für die Aufreinigung der DNA nach einer PCR oder Auftrennung im Agarosegel wurde jeweils der gesamte Ansatz verwendet und mit entsprechendem Volumen Membrane Binding Solution versetzt. Die Elution der DNA erfolgte mittels Zentrifugation über Säulchen und konnte anschließend für weitere Klonierungsschritte verwendet werden.

2.11.12 DNA Sequenzierung

Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung wurden die Plasmide sequenziert. Dazu wurden jeweils 50-100 ng/ μ l der Plasmid-DNA zu der Firma SeqLab (Göttingen, Deutschland) verschickt. Die DNA-Probe wurde auf 12 μ l mit doppelt destilliertem Wasser aufgefüllt. Für die Sequenzierung wurden zusätzlich 3 μ l Primer (Tabelle 21) hinzugegeben, mit einer Konzentration von 2 μ M. Nach Abschluss der Sequenzierung erfolgte die Überprüfung der Daten durch ein Alignment mit Hilfe des Programms SnapGene (2.12.4).

2.12 Software

2.12.1 Quantifizierung von Western Blots

a) Zur Auswertung der Western Blots wurde die Fiji Version des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ verwendet. Dies ist ein in Java geschriebenes Programm, das 1987 von Wayne Rasband entwickelt wurde [149].

Die Quantifizierung des Western Blots (2.12.1) erfolgte durch die Messung der Farbintensitäten der zu analysierenden Banden in einer TIF-Bilddatei. Hierfür wurde eine Messfläche festgelegt, die immer für die Analyse des gleichen Proteins verwendet wurde. Danach wurde mit der Gel-Auswertungsfunktion das Hintergrundsignal abgezogen und der Quotient aus den Messwerten der AUC (*area under the curve*) des Zielproteins und der Ladekontrolle ermittelt. Abschließend erfolgte die Normierung der Proben mit der jeweiligen DMSO-Kontrolle, welche hierfür auf 1 festgesetzt wurde.

b) Die Detektion einiger Western Blots erfolgte mit dem Geldokumentationssystem ChemiDoc™ der Firma Bio-Rad. Zur Auswertung wurde die dazugehörige Analyse-Software Image Lab™ 6.0.1 eingesetzt. Hierbei wurde das Signal des Zielproteins ebenfalls auf das der Ladekontrolle und der DMSO-Kontrolle normiert.

2.12.2 NCBI

NCBI (National Center for Biotechnology Information) ist die weltweit am meisten genutzte Internetplattform zur Recherche von DNA-, RNA- und Protein-Sequenzen verschiedener Spezies und Fachliteratur. NCBI ist unter anderem mit den Datenbanken PubMed, zur Recherche wissenschaftlicher Artikel, GenBank und Human Genome Resources verknüpft. Die beiden zuletzt genannten Datenbanken wurden zur Analyse der *Pim-1* mRNA Sequenz und der *Pim-1* Promotorsequenz herangezogen.

2.12.3 Vorhersage von Transkriptionsfaktor-Bindestellen

2.12.3.1 Homer

Bei der Software *Homer* [150] handelt es sich um ein Werkzeug zur Identifizierung von vordefinierten Sequenzmotiven, beispielsweise für Transkriptionsfaktor-Bindestellen. Die Autoren stellen zudem eine Datenbank mit experimentell ermittelten Bindemotiven von Proteinen, unter anderem für Mensch, Maus, Drosophila, bereit. Für die Analyse kam die Version 3.12 zum Einsatz. Für eine gegebene genomische Region werden Übereinstimmungen mit einem gewählten Suchmotiv mit einem „score“ bewertet. Dabei stellt ein *score* von 10 die bestmögliche Übereinstimmung dar. Die für die Analyse

verwendete Suchmaske definiert für jede Position eines Motivs nicht nur welche Base auftreten darf, sondern gewichtet auch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens und ist damit sehr spezifisch. Dadurch konnte die STAT3-Bindestelle, mit einem *score* von 9,55, innerhalb des 1 kb großen DNA-Abschnitts mit dem darin befindlichen Promotor von *Pim-1* identifiziert werden. Diese ist 926 Nukleotide vor dem Startcodons der *Pim-1* mRNA lokalisiert.

2.12.3.2 ALGGEN

Der ALGGEN Webserver [151] bietet unter anderem Onlinezugriff auf verschiedene bioinformatische Tools. Eines davon ist PROMO (v3.0.2), welches ähnlich zu *Homer* Transkriptionsfaktor-Bindestellen für einen gegebenen genomischen Bereich ermittelt. Im Unterschied zu *Homer* ist die für die Analyse verwendete Suchmaske größer. So ist für jede Position definiert, welche Base auftreten darf, ohne dass dabei die Wahrscheinlichkeit des Auftretens der Base gewichtet wird. Die Anwendung ermittelt ebenfalls die Übereinstimmung mit der gefundenen Motivsequenz in Form eines „score“-Wertes. Dabei stellt ein *score* von 1 die bestmögliche Übereinstimmung dar. Zudem werden gleichzeitig potentielle Bindestellen mehrerer Proteine erkannt. Mit PROMO konnten neben zwei STAT3-Bindestellen noch weitere Bindestelle anderer Transkriptionsfaktoren gefunden werden.

2.12.4 SnapGene

SnapGene (GSL Biotech) ist ein Programm für viele molekularbiologische Anwendungen. Durch die Visualisierung einzelner Klonierungsschritte, Darstellung unter anderem von Plasmidsequenzen, Plasmidkarten und Sequenzalignments, sowie Primern und Restriktionsenzymen wurde es zur Generierung der pFR-HCV_xb Plasmid-Konstrukte eingesetzt

3. Ergebnisse

Vorexperimente mit verschiedenen Statinen (Simvastatin, Atorvastatin, Lovastatin) haben gezeigt, dass eine Einzelbehandlung in der Leberkarzinom-Zelllinie (HepG2), Dickdarmkarzinom-Zelllinie (LS174T) und in primären humanen Makrophagen eine Verringerung der PIM1 Proteinlevel nach 48 Stunden bewirkt. Dieser PIM1 Knockdown konnte nach Zugabe von Mevalonat, dem direkten Produkt der HMG-CoA Reduktase, wieder aufgehoben werden. Zudem wurde die effektive Dosis der verschiedenen Statine für die jeweiligen Zellen bestimmt. Weiterhin konnte bereits eine Dosis-abhängige anti-proliferative Wirkung von Simvastatin in HepG2 und LS174T Zellen nachgewiesen werden.

Simvastatin stellt eines der gebräuchlichsten Statine mit einer hohen Effektivität und guten Verträglichkeit dar [152], weshalb es zur Behandlung der Krebszellen bei diesem Projekt eingesetzt wurde. Da Simvastatin in DMSO gelöst vorliegt, wurden zur Kontrolle ein Teil der Zellen in jedem Experiment ebenfalls mit DMSO versetzt.

3.1 Charakterisierung der Statin-vermittelten Regulation der PIM1 Kinase in Krebszellen

Wie bereits erwähnt (1.2.2), kommt es durch den Einsatz von Statinen zur Hemmung der HMG-CoA Reduktase, was eine Abnahme der Cholesterin-Biosynthese in der Leber zur Folge hat. Dadurch erfolgt als Gegenmaßnahme die verstärkte Expression von SREBP-1 und -2 [34] sowie von miR-33a, welche zusammen mit dem *Srebp-2* co-transkribiert wird [35]. Zudem ist bekannt, dass *Pim-1* ein Zielmolekül von miR-33a darstellt, dessen Bindung zur Destabilisierung der *Pim-1* mRNA führt (1.3.2) [71]. Somit besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Statinen, miR-33a und *Pim-1*, der vermuten lässt, dass Statine den PIM1 Knockdown über miR-33a regulieren.

Zur Aufklärung des Einflusses von Simvastatin auf die *Pim-1* 3'-UTR sowie auf die Bindung von miR-33a an die *Pim-1* mRNA, erfolgte die ektopische Expression von verschiedenen *Pim-1* cDNA Konstrukten (2.5.1.-2.5.1.2) in Skov3 Zellen. Denn ein Merkmal dieser Krebszelllinie ist die ausbleibende Expression des PIM1 Proteins, wie in den ersten vier Spuren des in Abbildung 12 (a) dargestellten Western Blots zu erkennen ist.

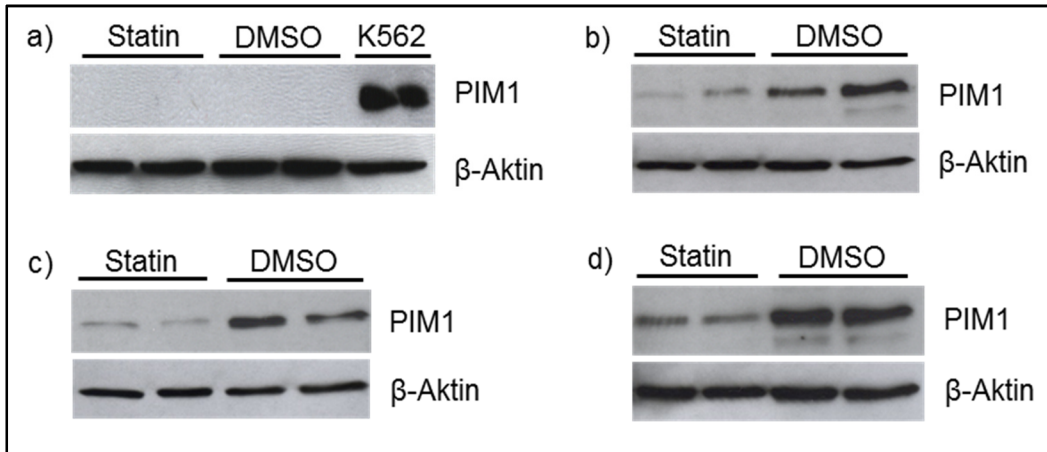


Abb.12: PIM1 Western Blot nach Transfektion von pCMV6-XL4 PIM1 cDNA Konstrukten in Skov3 Zellen. Die Zellen wurden entweder für 48 Stunden mit 5 μ M Simvastatin oder DMSO behandelt. Die Inkubation der Zellen mit DMSO erfolgte in gleichen Volumenverhältnissen entsprechend der Simvastatin-Behandlung. Für jede Behandlung wurden jeweils 2 unabhängige Zellproben untersucht. β -Aktin diente als Ladekontrolle. a) Proben untransfizierter Skov3 Zellen, K562 Zellen als Positivkontrolle b) Transfektion des pCMV6-XL4 PIM1 (WT) cDNA Plasmids c) Transfektion des pCMV6-XL4 PIM1 Δ 3'-UTR cDNA Plasmids d) Transfektion des pCMV6-XL4 PIM1 3'mut33a cDNA Plasmids. Der Western Blot erfolgte unter folgenden Bedingungen: PIM1: 1:500 ÜN, goat anti mouse IgG-HRP 1:4000 für 1 h; β -Aktin: β -Aktin AK und goat anti mouse IgG-HRP jeweils 1:10000 für 2 h.

Die Abbildungen 12 (b), (c) und (d) zeigen das Ergebnis der PIM1 Detektion nach Transfektion drei verschiedener PIM1 cDNA Plasmide, deren Expression der Kontrolle eines CMV-Promotors unterliegen. Wie auch schon in (a) wurden die Zellen entweder mit Simvastatin oder DMSO für 48 Stunden behandelt. Zu Beginn wird bereits deutlich, dass Statine auch ektopisch exprimiertes *Pim-1* herunterregulieren können, unabhängig davon ob es sich hierbei um die Wildtyp (WT) Form (b) der *Pim-1* mRNA, der *Pim-1* mRNA ohne 3'-UTR (c) oder der mit mutierter Bindestelle von miR-33a (d), handelt. Denn bei einem Vergleich dieser Proben mit den jeweiligen DMSO-Kontrollen ist ein reduziertes PIM1 Signal bei annähernd gleichbleibenden β -Aktin-Leveln zu erkennen. Da die in dieser Abbildung erkennbaren Statin-Effekte ohne Vorhandensein des *Pim-1* Promotors detektiert werden konnten, kann eine Statin-bedingte Regulation von *Pim-1* über die transkriptionelle Ebene in Skov3 Zellen ausgeschlossen werden. Zudem ergeben sich erste Hinweise darauf, dass Statine ihre inhibitorische Wirkung auf *Pim-1* nicht über dessen 3'-UTR oder die Induktion von miR-33a vermitteln. Aus diesem Grund wurden zur weiteren Aufklärung des Statin-vermittelten Knockdowns von PIM1 verschiedene Untersuchungen auf allen zellulären Regulationsebenen durchgeführt. Diese erfolgten in den Krebszelllinien HepG2 und LS174T, welche kein artifizielles System, wie Skov3 Zellen, bezüglich PIM1 darstellen.

3.1.1 Analyse des Statin-vermittelten *Pim-1* Knockdowns auf transkriptioneller Ebene

Die Transkription stellt eine der wichtigsten Ebenen zur Regulation der PIM1 Kinase dar, welche über die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren an den Promotor erfolgen kann [61]. Seine Genexpression wird unter anderem durch Hormone und verschiedene Cytokine gesteuert, die den JAK/STAT-Signalweg auslösen [61, 62]. Darüber hinaus können weitere Transkriptionsfaktoren den *Pim-1* Promotor binden und somit dessen Transkription verstärken (1.3.1) [63]. Aus diesem Grund wurden sowohl die mRNA Level von *Pim-1* mittels RT-qPCR als auch dessen Transkriptionseffizienz mit Hilfe des Dual-Luciferase-Assays nach Simvastatin-Gabe bestimmt.

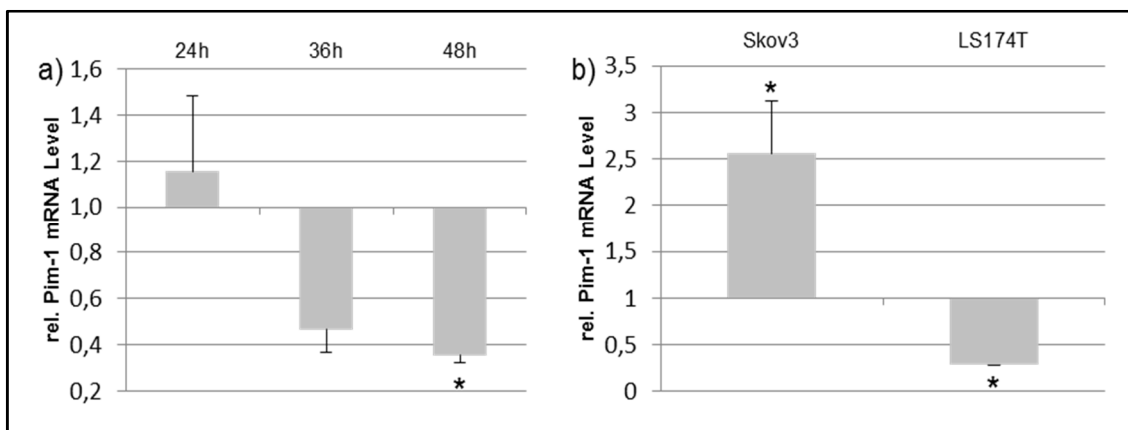


Abb.13: RT-qPCR Experiment. Relative *Pim-1* mRNA Level nach Simvastatin-Behandlung normiert auf β -Aktin und DMSO. a) HepG2 Zellen inkubiert mit 10 μ M Simvastatin über 24 h (n=6), 36 h (n=6) und 48 h (n=14). b) Skov3 Zellen inkubiert mit 5 μ M Simvastatin (n=7) und LS174T Zellen inkubiert mit 25 μ M Simvastatin (n=3) jeweils über 48 Stunden. Die Inkubation der Zellen mit DMSO erfolgte in gleichen Volumenverhältnissen entsprechend der jeweiligen Simvastatin-Behandlung und Dauer. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von n unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz der Expressionslevel ist als P-Wert folgendermaßen angegeben: *p< 0,05.

Die Abbildung 13 zeigt die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte, welche den relativen *Pim-1* mRNA Spiegeln entsprechen. Das in (a) abgebildete Diagramm stellt die *Pim-1* Expressionslevel in HepG2 Zellen nach einer Simvastatin-Behandlung über 24, 36 und 48 Stunden dar. Bei Betrachtung der 24 Stunden Proben deutet sich eine schwache Hochregulation der *Pim-1* mRNA mit einem Mittelwert von 1,15 an. Auf Grund der Streuung der Werte einzelner Proben zu diesem Zeitpunkt, kommt es zu einer hohen Standardabweichung von 0,33. Nach 36 Stunden Simvastatin-Inkubation ist eine Verringerung der *Pim-1* mRNA Level um 54 % zu erkennen. Hier kann allerdings keine signifikante Reduktion

der *Pim-1* mRNA Spiegel beobachtet werden, da die einzelnen Mittelwerte ebenfalls zu stark variieren. Durch eine Statin-Behandlung um weitere 12 Stunden sinken die *Pim-1* mRNA Level noch weiter und zeigen mit einem Wert von 0,35 eine signifikante Reduktion von 65 %.

In Abbildung (b) sind die *Pim-1* Expressionslevel nach 48 Stunden Simvastatin-Gabe in den Skov3 (links) und LS174T Zellen (rechts) dargestellt. Die Skov3 Zellen zeigen hierbei eine 2,5-fache, signifikante Zunahme der *Pim-1* mRNA Spiegel im Vergleich zu der für die Normierung eingesetzten DMSO-Kontrolle. Interessant ist hierbei nicht nur, dass die *Pim-1* mRNA Level hochreguliert sind, sondern dass es generell zur Transkription des *Pim-1* Gens kommt. Denn wie aus der Abbildung 12 (a) bereits hervorgegangen ist, wird die *Pim-1* mRNA gar nicht oder nur in sehr geringer Menge zum Protein translatiert, sodass PIM1 im Western Blot der Skov3 Zellen nicht detektiert werden kann. In den LS174T Zellen hingegen sind die *Pim-1* mRNA Level, wie auch in den HepG2 Zellen, nach 48 Stunden Statin-Behandlung um 72 % signifikant erniedrigt im Vergleich zur DMSO-Kontrolle.

Wie oben erwähnt, wird die transkriptionelle Regulation von *Pim-1* vornehmlich über den JAK/STAT-Weg gesteuert [61]. Dabei werden die STAT-Proteine durch JAK phosphoryliert und dadurch aktiviert, woraufhin sie anschließend in den Zellkern wandern und als Transkriptionsfaktoren agieren. 2013 konnten Fang und Kollegen zeigen, dass Simvastatin den JAK2/STAT3-Signalweg inhibiert [153]. Da STAT3 einen wichtigen Transkriptionsfaktor zur Induktion des *Pim-1* Gens in Krebszellen darstellt [154], wurde die Bindung von STAT3 an den *Pim-1* Promotor unter Statin-Einfluss mit Hilfe des Dual-Luciferase-Reporterassays untersucht. Hierfür kam ein Dual-Luciferase-Plasmid mit verschiedenen STAT3 Bindestellen-Varianten des *Pim-1* Promotors zum Einsatz (2.5.2.1-2.5.2.4). Darüber hinaus konnte mit Hilfe dieses Assays auch der Einfluss von anderen Statin-regulierten Transkriptionsfaktoren auf die Transkription von *Pim-1* analysiert werden.

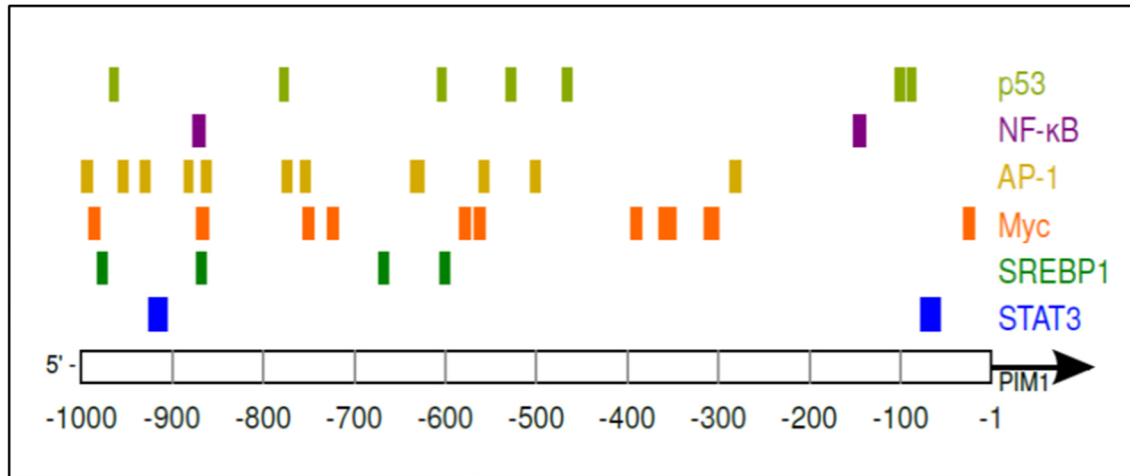


Abb.14: Übersicht der Bindestellen Statin-regulierter Transkriptionsfaktoren innerhalb des 1 kb großen DNA-Abschnittes mit dem darin befindlichen *Pim-1* Promotor stromaufwärts des Startcodons der *Pim-1* mRNA. Die Vorhersage dieser Transkriptionsfaktor-Bindestellen erfolgte mit Hilfe des ALGGEN Servers.

Die in Abbildung 14 dargestellte Übersicht zeigt die verschiedenen Bindestellen diverser Statin-regulierter Transkriptionsfaktoren, der vom *Pim-1* Startcodon stromaufwärts gelegenen DNA-Sequenz, welche für den nachfolgenden Dual-Luciferase-Assay (Abb.15) in das pFR_HCV_xb Plasmid kloniert wurde. Die Vorhersage dieser Bindestellen erfolgte mit Hilfe des ALGGEN Webservers.

Wie aus dieser Abbildung 14 hervorgeht, handelt es sich bei den oben angegebenen Statin-regulierten Transkriptionsfaktoren um den Tumorsuppressor p53 [21, 40], NF-κB [21, 39, 40, 155], AP-1 (*activator protein*) [21], dem Proto-Onkogen Myc [39, 40] und SREBP-1 (*sterol response element binding protein-1*) [34, 39], welche die Transkription induzieren können. Zudem sind hier 2 ISFR/GAS-Sequenzen (*gamma interferon activation sequence*) zu erkennen, welche Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren STAT1 beziehungsweise STAT3 (*signal transducers and activators of transcription*) darstellen [39, 40, 153]. Diese sind an den Positionen -78 und -926 lokalisiert und weisen jeweils einen score von 0,71 und 0,75, eines möglichen Maximalwertes von 1, auf. Der niedrigste „score“-Wert aller ermittelten Transkriptionsfaktor-Bindestellen stellt dabei die STAT3-Bindestelle an der Position -78 dar. Allerdings konnte durch die Software *Homer* nur die 926 Nukleotide vor dem *Pim-1* Startcodon lokalisierte STAT3-Bindestelle vorhergesagt werden. Da mittels *Homer* für diese Bindestelle ein sehr hoher score von 9,55, bei einem möglichen Maximalwert von 10, vorhergesagt wurde und das STAT3-Bindemotiv an Position -78 hiermit nicht ermittelt werden konnte, erfolgte lediglich die Analyse der STAT3-Bindestelle an Position -926 für die Versuche des Dual-Luciferase-Assays.

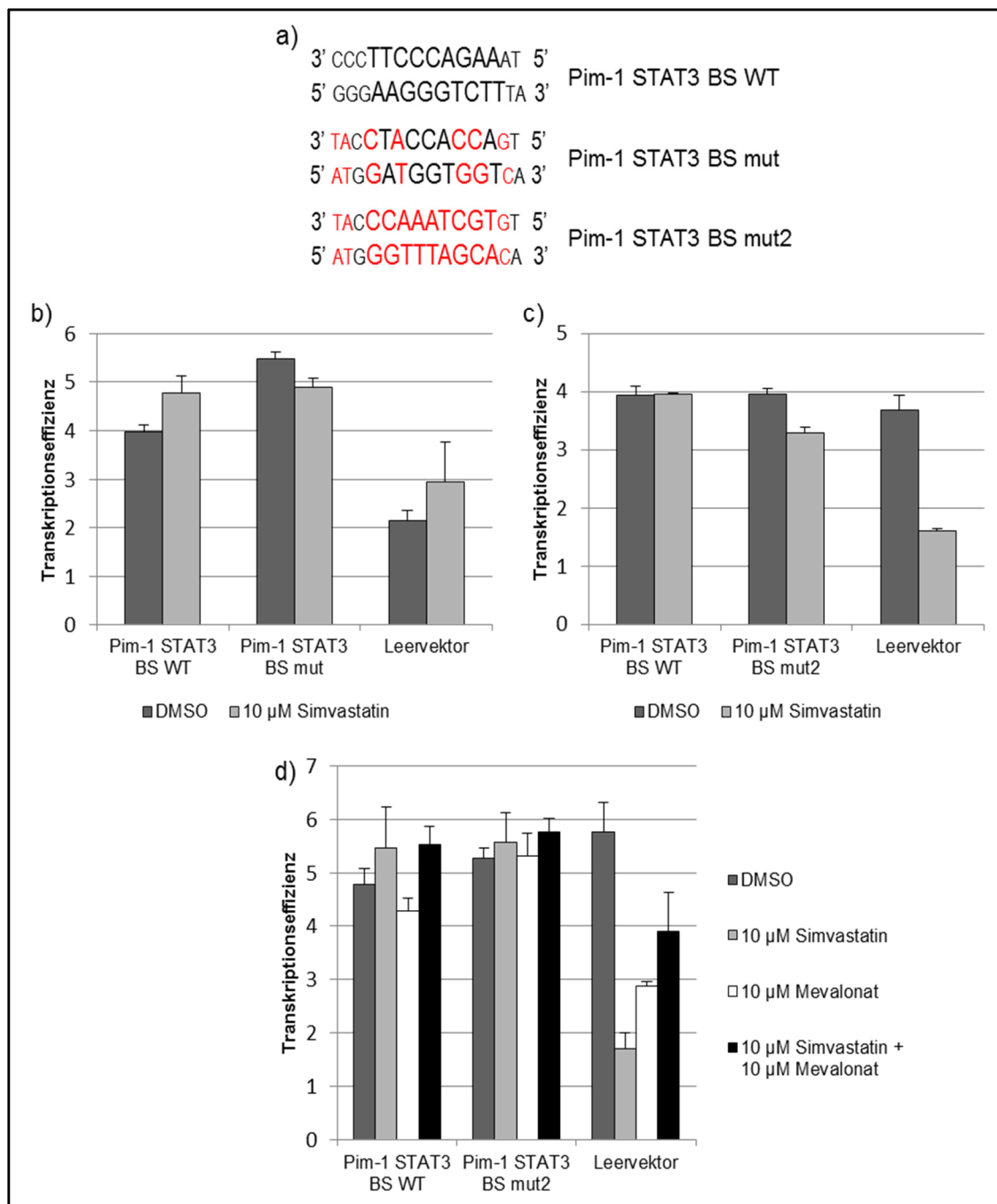


Abb.15: Dual-Luciferase-Assay. a) STAT3-Bindestelle (BS) des Wildtyps (WT) und zwei verschiedener Mutations-Varianten (mut, mut2). Die in Kleinbuchstaben abgebildeten Nukleotide stellen die flankierende Sequenz der in Großbuchstaben abgebildeten Konsensussequenz der STAT3-Bindestelle des *Pim-1* Promotors dar. Rot gekennzeichnete Nukleotide wurden gegenüber dem Wildtyp ausgetauscht. Transfektion verschiedener pFR_HCV_xb *Pim-1* Promotor-Konstrukte mit den oben dargestellten STAT3 Bindestellen-Varianten in HepG2 Zellen zur Messung der Transkriptionseffizienz (Firefly-Luciferase) normiert auf die Renilla-Luciferase (Transfektionskontrolle) und das Firefly-Luciferase Hintergrundsignal (pFR_HCV_xb Leervektor ohne HSV TK-Promotor). Die Zellen wurden für 48 Stunden entweder mit b) + c) 10 µM Simvastatin (hellgrau) oder DMSO (dunkelgrau) und in d) mit 10 µM Simvastatin (hellgrau), 10 µM Mevalonat (weiß), 10 µM Simvastatin + 10 µM Mevalonat (schwarz) oder DMSO (dunkelgrau) behandelt. Die Inkubation der Zellen mit DMSO erfolgte in gleichen Volumenverhältnissen entsprechend der jeweiligen

Behandlung. b) Transfektion von pFR_HCV_xb +Pim-1 STAT3 BS WT, pFR_HCV_xb+Pim-1 STAT3 BS mut und pFR_HCV_xb Leervektor (n=4 bis 8). c) Transfektion von pFR_HCV_xb+Pim-1 STAT3 BS WT, pFR_HCV_xb+Pim-1 STAT3 BS mut2 und pFR_HCV_xb Leervektor (n=32). d) pFR_HCV_xb+Pim-1 STAT3 BS WT, pFR_HCV_xb+Pim-1 STAT3 BS mut2 und pFR_HCV_xb Leervektor (n=3 bis 5). Der pFR_HCV_xb Leervektor diente als Kontrolle des Statin-Einflusses auf das Plasmidbackbone. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von n unabhängigen Zellproben.

Mit Hilfe des in Abbildung 15 dargestellten Dual-Luciferase-Assays kann die Transkriptionseffizienz unter Berücksichtigung der Bindung von STAT3 und anderer Transkriptionsfaktoren an den *Pim-1* Promotor ermittelt werden. Der circa 1 kb große Bereich stromaufwärts des *Pim-1* Startcodons mit der darin befindlichen STAT3-Bindestelle (BS) ist dem Firefly-Luciferase-Gen vorgelagert, sodass über die Messung des umgesetzten Substrates, Luciferin zu Oxiluciferin, durch die Firefly-Luciferase die Transkriptionsaktivität bestimmt werden kann. Demnach ist ein starkes Lumineszenz-Signal bei der Analyse des *Pim-1* Promotor-Konstruktes mit der Wildtyp (WT) STAT3-Bindestelle nach DMSO-Behandlung zu erwarten, da hier der aktive, phosphorylierte Transkriptionsfaktor STAT3 binden und die Expression induzieren kann. Nach Simvastatin-Behandlung der transfizierten Zellen sollte die Expression der Firefly-Luciferase und die damit gemessene Chemilumineszenz auf Grund geringerer Phospho-STAT3 Level sinken, wenn der Statin-vermittelte *Pim-1* Knockdown hierüber reguliert wird. Durch eine Inkubation der Zellen mit Mevalonat oder der Doppelbehandlung von Simvastatin und Mevalonat würde wieder eine Zunahme des Lichtsignals angenommen werden, da Mevalonat das Endprodukt des gleichnamigen Syntheseweges, welcher durch Statine inhibiert wird, darstellt. Bei dem *Pim-1* Promotor-Konstrukt mit einer mutierten STAT3-Bindestelle ist die Bindung des Transkriptionsfaktors nicht möglich, weshalb die Detektion eines schwächeren Lumineszenz-Signals im Vergleich zum *Pim-1* Promotor-Konstrukt mit einer Wildtyp STAT3-Bindestelle bei DMSO-Gabe anzunehmen ist. Erwartungsgemäß würde dieses Signal bei einer Statin-Inkubation unverändert bleiben, weil die Bindung des STAT3 Transkriptionsfaktors weiterhin blockiert ist, unabhängig von der Behandlung der Zellen. Allerdings sollte in diesem Zusammenhang noch die Möglichkeit des Vorhandenseins weiterer STAT3-Bindestellen oder der Einfluss anderer, Transkriptions-induzierender Transkriptionsfaktoren, wie jene aus Abbildung 14, berücksichtigt werden. Dabei wäre unter Statin-Gabe eine gleichmäßig verringerte Firefly-Luciferase-Expression beider *Pim-1* Promotor-Konstrukte (Wildtyp und Mutante) anzunehmen, was auf einen Statin-vermittelten *Pim-1* Knockdown durch die Herunterregulation von Transkriptionsfaktoren hindeuten würde.

Der in (b) abgebildete Dual-Luciferase-Assay zeigt nach Simvastatin-Gabe allerdings eine erhöhte Firefly-Luciferase-Expression des *Pim-1* STAT3 BS WT Konstruktes im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Unter selben Bedingungen ist zudem eine annähernd unveränderte Transkriptionsaktivität des *Pim-1* STAT3 BS mut Konstruktes erkennbar. Dieses Promotor-Plasmidkonstrukt weist einen partiellen Basenaustausch der STAT3-Bindestelle gegenüber der Wildtyp-Sequenz auf, wie aus der mittleren Sequenz der Abbildung 15 (a) zu entnehmen ist. Darüber hinaus wurde hier sogar eine circa 1,5-fach gesteigerte Expression der Firefly-Luciferase nach DMSO-Behandlung der Zellen detektiert. Weiterhin zeigt das Chemilumineszenz-Signal des Leervektors einen induzierenden Einfluss von Simvastatin, da nach dieser Behandlung ein Anstieg der Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu verzeichnen ist.

Der in Abbildung 15 (c) dargestellte Dual-Luciferase-Assay zeigt eine gleichbleibende Transkriptionseffizienz des *Pim-1* STAT3 BS WT Konstruktes nach Statin-beziehungsweise DMSO-Behandlung. Beim *Pim-1*-Promotor-Konstrukt mit vollständigem Basenaustausch der STAT3-Bindestelle (mut2) ist wie beim *Pim-1* STAT3 BS mut Konstrukt eine verringerte Expression der Firefly-Luciferase nach Simvastatin-Inkubation um ungefähr 0,7 im Vergleich zur DMSO-Behandlung der Zellen zu erkennen. Des Weiteren scheint Simvastatin, anders als in Abbildung (b), eine reprimierende Wirkung auf den Leervektor zu haben, denn unter diesen Bedingungen kann eine deutliche Abnahme des Lumineszenz-Signals um das 2,1-fache detektiert werden.

Im Dual-Luciferase-Assay der Abbildung 15 (d) ist eine Zunahme der Transkriptionsaktivität der Firefly-Luciferase des *Pim-1* STAT3 BS WT Konstruktes nach Simvastatin-Gabe um circa 0,7 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu sehen. Die Einzelbehandlung der HepG2 Zellen mit Mevalonat zeigt das schwächste Chemilumineszenz-Signal des *Pim-1* STAT3 BS WT Promotor-Konstruktes. Die Transkriptionsaktivität der Firefly-Luciferase des *Pim-1* STAT3 BS WT Konstruktes nach der Doppelbehandlung von Simvastatin und Mevalonat ist ähnlich hoch wie das bei alleiniger Statin-Gabe. Dies kann auch für das *Pim-1* STAT3 BS mut2 Konstrukt beobachtet werden. Eine annähernd gleiche Expressionsrate der Firefly-Luciferase des *Pim-1* STAT3 BS mut2 Konstruktes ist ebenfalls nach der DMSO- und Mevalonat-Behandlung zu erkennen. Zudem zeigt auch hier die Simvastatin-Behandlung eine Erhöhung der Transkriptionseffizienz der Firefly-Luciferase um ungefähr 0,3 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Allerdings kann unter diesen Bedingungen eine 4-fache Reduktion des Lumineszenz-Signals auf den Leervektor detektiert werden. Dadurch kann die bereits in Abbildung 15 (c) dargestellte supprimierende Wirkung von Simvastatin auf das Leerplasmid bestätigt werden. Das Chemilumineszenz-Signal der Mevalonat-Inkubation sowie der Doppelbehandlung von Simvastatin und Mevalonat

zeigen jeweils eine Abnahme um 2,9 und 1,8 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Jedoch liegt das Expressionslevel der Firefly-Luciferase der Doppelbehandlung um das 2,2-fache höher als das nach Simvastatin-Behandlung der Zellen, was auf eine Aufhebung der angenommenen abschwächenden Statin-Wirkung auf den *Pim-1* Promotor schließen lässt.

3.1.2 Analyse des Statin-vermittelten *Pim-1* Knockdowns auf posttranskriptioneller Ebene

Eine Möglichkeit zur Regulation der Genexpression stellt der mRNA Abbau auf posttranskriptioneller Ebene, vermittelt durch das 5'-Ende oder die 3'-UTR, dar. Hierbei können neben miRNAs auch RNA-Bindeproteine an die 3'-UTR binden und somit die mRNA-Stabilität beeinflussen [156]. Tristetraprolin, kurz TTP, ist ein RNA-Bindeprotein vieler mRNAs. Eine Bindung in einem A/U-reichen Element (ARE) der 3'-UTR führt zur Destabilisierung der mRNA.

Zur Validierung des Ergebnisses aus dem Transfektionsexperiment in den Skov3 Zellen (Abb.12) bezüglich der Regulation der *Pim-1* mRNA Stabilität durch Statine, wurde der Einfluss von Simvastatin auf die TTP-Proteinlevel in HepG2 und LS174T Zellen untersucht. Denn andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass die *Pim-1* mRNA ein Zielmolekül von TTP darstellt [67, 119].

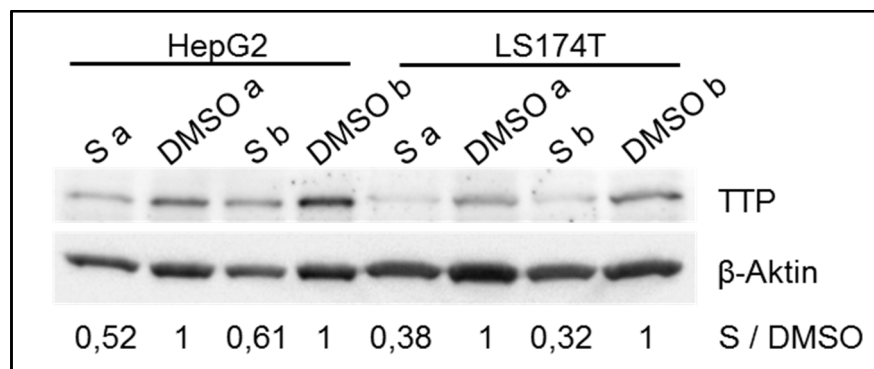


Abb.16: TTP Western Blot nach 48 stündiger Statin-Inkubation in HepG2 Zellen (Zugabe von 10 μ M Simvastatin: „S“) und in LS174T Zellen (Zugabe von 25 μ M Simvastatin: „S“). Die Inkubation der Zellen mit DMSO erfolgte in gleichen Volumenverhältnissen entsprechend der jeweiligen Simvastatin-Behandlung. Bei den Proben „a“ und „b“ handelt es sich um unabhängige Zellproben, welche jeweils gleichen Bedingungen unterlagen. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Quantifizierung erfolgte mittels Image Lab und ist unterhalb der Abbildung dargestellt. Der Western Blot erfolgte unter folgenden Bedingungen: TTP: 1:2000 ÜN, donkey anti goat IgG-HRP 1:6000 für 30 min; β -Aktin: β -Aktin AK und m-IgG BP-HRP jeweils 1:20000 für 1h 45min.

Der in Abbildung 16 dargestellte Western Blot zeigt die Detektion von TTP nach 48 Stunden Statin- oder DMSO-Inkubation in HepG2 und LS174T Zellen. Auf Grund der leichten Schwankungen der β -Aktin Level zwischen der Statin- und DMSO-Behandlung der Zellen, wurden zunächst die TTP-Proteinsignale auf die von β -Aktin normiert und anschließend die hieraus erhaltenen Werte der Statin-Proben durch die der entsprechenden DMSO-Kontrollprobe geteilt. Bei einem Vergleich der DMSO-Kontrollproben beider Zelllinien lässt sich erkennen, dass in HepG2 Zellen höhere TTP-Proteinlevel vorliegen als in LS174T Zellen. Eine Gemeinsamkeit beider Zelllinien ist jedoch die Abnahme des TTP-Signals in den Proben, die einer Statin-Behandlung unterzogen wurden, im Vergleich zu denen der DMSO-Behandlung. Hierbei weisen die Statin-Proben der LS174T Zellen eine Reduktion der TTP-Level von 32-38 % und die der HepG2 Zellen von 52-61 % auf.

Da die RT-qPCR keinen Aufschluss darüber geben kann, ob eine Veränderung der mRNA Level einer Inhibition der Transkription oder eines verstärkten mRNA Abbaus zu Grunde liegt, bleiben die Statin-Effekte auf die *Pim-1* mRNA in den HepG2 und LS174T Zellen, in Abbildung 13, noch ungeklärt. Einen möglichen Hinweis könnte das nachfolgende RT-qPCR Experiment in Abbildung 17 geben. Hierbei kam α -Amanitin zum Einsatz, welches mit einer sehr hohen Sensitivität gegenüber der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II die mRNA Neubildung hemmt [132, 157]. Dadurch können Rückschlüsse auf den Abbau der *Pim-1* mRNA gezogen werden. Um deutliche Effekte aus der Behandlung der HepG2 Zellen mit α -Amanitin und der Doppelbehandlung mit Simvastatin + α -Amanitin erzielen zu können, wurde der Inhibitor der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II bereits nach 24 Stunden Simvastatin-Präinkubation den Zellen verabreicht, da zu diesem Zeitpunkt noch keine verringerten *Pim-1* mRNA Level durch den Einfluss von Statinen nachgewiesen werden können und somit eine mögliche Abnahme der *Pim-1* mRNA Level durch α -Amanitin detektiert werden kann.

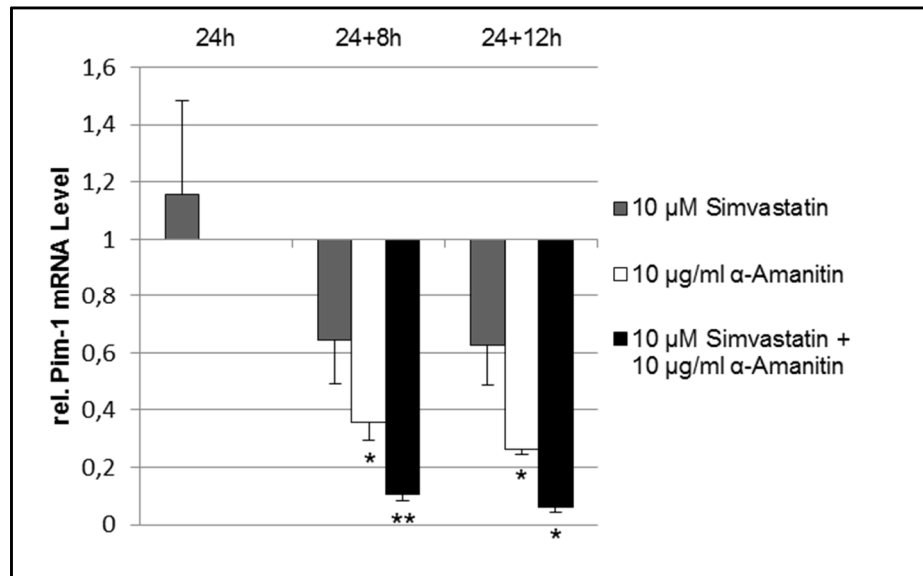


Abb.17: RT-qPCR Experiment. Relative *Pim-1* mRNA Level in HepG2 Zellen nach 24 h, 32 h und 36 h normiert auf β -Aktin und DMSO. Die Inkubation der Zellen mit 10 μ M Simvastatin (dunkelgrau) erfolgte über die oben angegebenen Zeiträume. Die Behandlung der Zellen mit 10 μ g/ml α -Amanitin (weiß) oder 10 μ M Simvastatin + 10 μ g/ml α -Amanitin (schwarz) wurde nach 24 h (n=6) über weitere 8 h (n=3) und 12 h (n=3) durchgeführt. Die Inkubation der Zellen mit DMSO erfolgte in gleichen Volumenverhältnissen entsprechend der jeweiligen Behandlung und Dauer. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von n unabhängigen Zellproben. Die Signifikanz der Expressionslevel ist als P-Wert folgendermaßen angegeben: *p < 0,05, **p < 0,01.

Die RT-qPCR aus Abbildung 17 zeigt die relativen *Pim-1* mRNA Spiegel in HepG2 Zellen nach 24, 32 und 36 Stunden. Nach einer 24 stündigen Simvastatin-Gabe von 10 μ M ist ein schwacher Anstieg der *Pim-1* mRNA Level von 1,15 im Vergleich zur DMSO-Behandlung zu erkennen. Jedoch weist dieser Mittelwert durch Schwankungen einzelner Proben eine Standardabweichung von 0,33 auf. Bei längerer Inkubationszeit der Zellen mit Simvastatin von 32 und 36 Stunden ist hingegen eine Abnahme der *Pim-1* mRNA Level um jeweils 36 % und 38 % zu verzeichnen. Durch die Zugabe von α -Amanitin nach 24 Stunden kommt es zur Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II, wodurch keine neue mRNA mehr gebildet werden kann. Dies wird in den Proben der α -Amanitin-Einzelbehandlung nach 8 und 12 Stunden deutlich. Hier kann eine signifikante Verringerung der *Pim-1* mRNA um 64 % nach 8 Stunden und 74 % nach 12 Stunden detektiert werden. Die stärkste Reduktion der *Pim-1* mRNA Level ist jedoch nach der Doppelbehandlung mit Simvastatin und α -Amanitin zu erkennen. Nach 8 Stunden sind die *Pim-1* mRNA Spiegel signifikant um 90 % vermindert im Vergleich zur DMSO-Probe und nach 12 Stunden sogar um 94 %.

3.1.3 Analyse des Statin-vermittelten *Pim-1* Knockdowns auf translationeller Ebene

Zur Bestimmung der Stärke des eingangs erwähnten PIM1 Knockdown-Effektes auf Proteinebene, wurden die Proben der HepG2- und LS174T Zellen nach 48 Stunden Simvastatin-Behandlung, entsprechend der jeweiligen effektiven Dosis, in einen Western Blot eingesetzt und anschließend quantitativ ausgewertet.

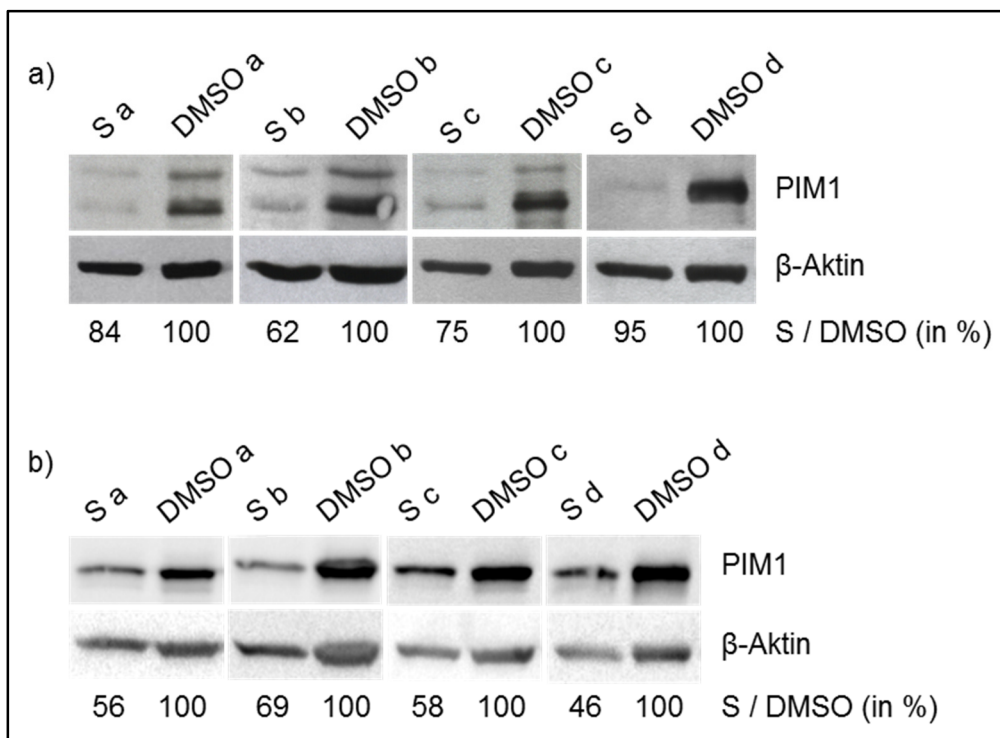


Abb.18: PIM1 Western Blot nach 48 stündiger Statin-Inkubation in a) HepG2 Zellen (Zugabe von 10 μ M Simvastatin: „S“) und in b) LS174T Zellen (Zugabe von 25 μ M Simvastatin: „S“). Die Inkubation der Zellen mit DMSO erfolgte in gleichen Volumenverhältnissen entsprechend der jeweiligen Simvastatin-Behandlung. Bei den Proben „a“, „b“, „c“ und „d“ handelt es sich um vier unabhängige Experimente, welche gleichen Bedingungen unterlagen. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Quantifizierung erfolgte mittels ImageJ (HepG2 Zellen) oder Image Lab (LS174T Zellen) und ist jeweils unterhalb der Abbildung dargestellt. Der Western Blot erfolgte unter folgenden Bedingungen: a) für die Proben „a“ und „b“: PIM1: 1:500 ÜN, anti mouse IgG-HRP 1:5000 für 45 min; β -Aktin: β -Aktin AK und m-IgG BP-HRP jeweils 1:30000 für 2h. Für die Probe „c“: PIM1: 1:500 ÜN, anti mouse IgG-HRP 1:4000 für 45 min; β -Aktin: β -Aktin AK und m-IgG BP-HRP jeweils 1:30000 für 2h. Für die Probe „d“: PIM1: 1:1000 ÜN, anti rabbit IgG-HRP 1:5000 für 50 min; β -Aktin: β -Aktin AK und m-IgG BP-HRP jeweils 1:30000 für 2h. b) PIM1: 1:1000 ÜN, anti rabbit IgG-HRP 1:5000 für 43 min; β -Aktin: β -Aktin AK und m-IgG BP-HRP jeweils 1:20000 für 1h 30min bis 2h 20min.

Die in Abbildung 18 dargestellten Western Blots der Zelllinien HepG2 (a) und LS174T (b) zeigen jeweils die Detektion von PIM1 und der internen Kontrolle β -Aktin. Zur

Beurteilung der Stärke der Simvastatin-vermittelten Herunterregulation von PIM1 wurden diese Proteinlevel mit den dazugehörigen β -Aktin Proteinsignalen und der ebenfalls normierten DMSO-Kontrolle berechnet. Bei Betrachtung der β -Aktin Level der HepG2 und LS174T Zellen wird deutlich, dass diese in den DMSO-Behandlungen im Vergleich zu den mit Simvastatin inkubierten Proben leicht erhöht sind. In beiden Zelllinien sind die PIM1 Signale der DMSO-Proben deutlich höher als die nach Statin-Behandlung. Dies kann durch die Quantifizierung bestätigt werden. In den Statin-Proben der HepG2 Zellen wurde eine Reduktion der PIM1 Proteinlevel von 62 bis 95 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ermittelt. In den mit Simvastatin-behandelten LS174T Zellen konnte, gegenüber Proben nach einer DMSO-Inkubation, eine Inhibition des PIM1 Proteinsignals von 46 bis 69 % bestimmt werden. Somit wird deutlich, dass der PIM1 Knockdown in der Leberkarzinom-Zelllinie, trotz einer geringeren Statin-Dosis, stärker ist als in der Dickdarmkarzinom-Zelllinie mit einer höher eingesetzten Simvastatin-Konzentration.

Translations-Initiationsfaktoren, wie zum Beispiel eIF4E, aber auch die stark strukturierte 5'-UTR und weitere regulatorische Sequenzabschnitte innerhalb der 5'-UTR von *Pim-1* können dessen *cap*-abhängige Translation regulieren (1.3.3) [64, 72]. Deshalb wurde der Einfluss von Simvastatin auf die Translationseffizienz von *Pim-1* mittels Inhibition der Translations-Elongation als auch über die Analyse einer *in vitro* Translation untersucht.

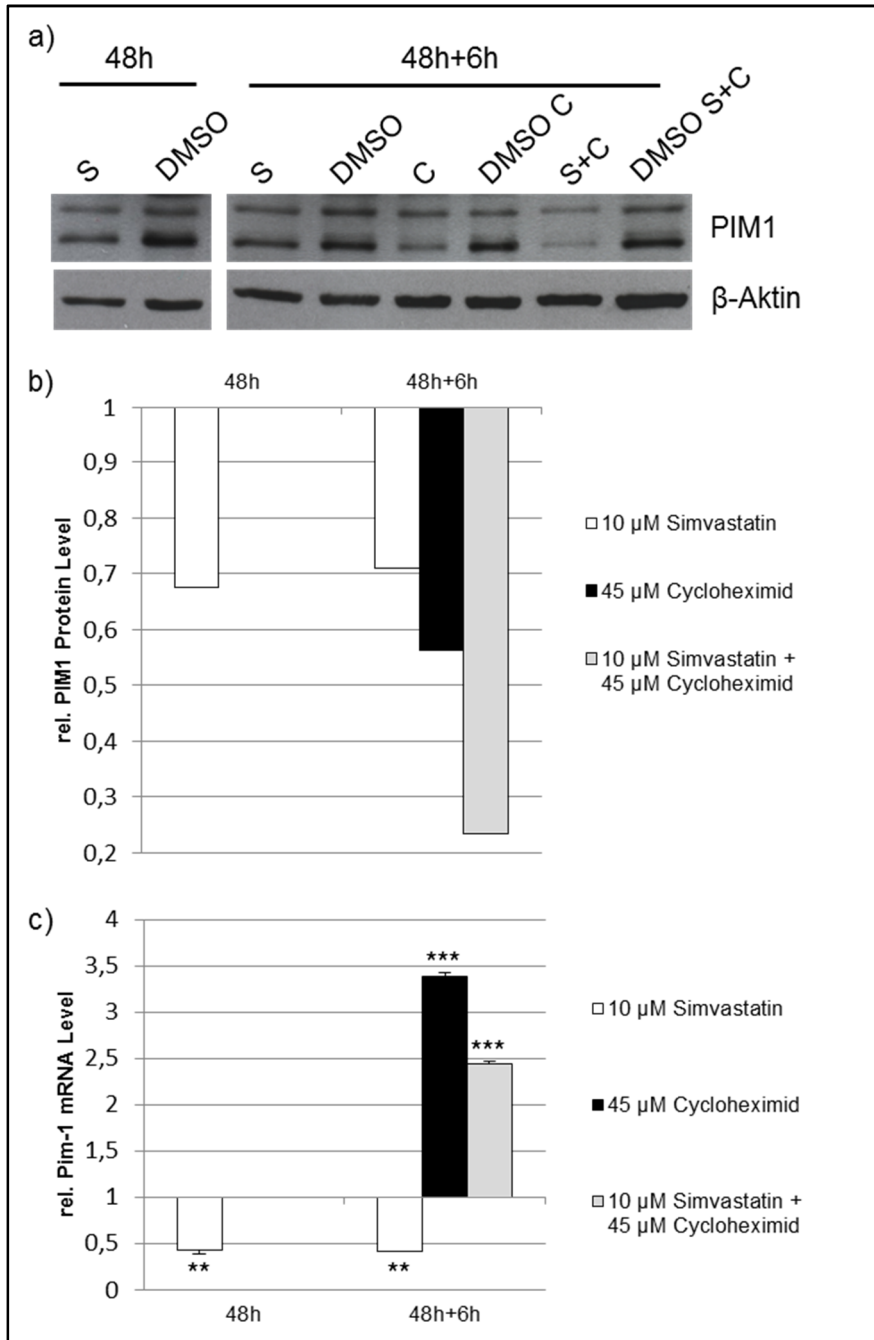


Abb.19: PIM1 Western Blot in HepG2 Zellen. Ein Teil der Zellen wurde für 48 Stunden entweder mit 10 μ M Simvastatin („S“, weiß) oder DMSO und anschließend für weitere 6 Stunden mit 10 μ M Simvastatin („S“, weiß), 45 μ M Cycloheximid („C“, schwarz) oder 10 μ M Simvastatin + 45 μ M Cycloheximid („S+C“, hellgrau) behandelt. Die Inkubation der Zellen mit DMSO erfolgte in gleichen Volumenverhältnissen entsprechend der jeweiligen Behandlung über 48 Stunden oder 48+6 Stunden. β -Aktin diente als Ladekontrolle. a) PIM1 Western Blot. Der Western Blot erfolgte unter folgenden Bedingungen: PIM1: 1:500 ÜN, m-IgG BP-HRP 1:4000 für 45 min; β -Aktin: β -Aktin AK und m-IgG BP-HRP jeweils 1:30000 für 1h 30min. b) Die Quantifizierung des Western Blots erfolgte mittels ImageJ. Die PIM1 Proteinlevel wurden normiert auf β -Aktin und DMSO. c) RT-qPCR Experiment. Relative *Pim-1* mRNA Level nach 48 h (n=3) und 48+6 h (n=6) normiert auf β -Aktin und DMSO. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von n unabhängigen Zellproben. Die Signifikanz der Expressionslevel ist als P-Wert folgendermaßen angegeben: **p < 0,01, ***p < 0,001.

Zur Analyse der Translations-Elongation wurde das Antibiotikum Cycloheximid eingesetzt. Dieses bindet an der Exit-Stelle in der großen Untereinheit des Ribosoms und verhindert dadurch das Lösen der deacetylierten tRNA, wodurch das Voranschreiten der Translation inhibiert wird [133].

Der in Abbildung 19 (a) dargestellte Western Blot zeigt Proben der HepG2 Zellen nach 48 stündiger Simvastatin-Präinkubation und einer weiteren Inkubation der Zellen von 6 Stunden mit jeweils Simvastatin, Cycloheximid, einer Doppelbehandlung von Simvastatin und Cycloheximid sowie DMSO. Nach 48 sowie 54 Stunden einer 10 μM Simvastatin-Gabe konnten geringere PIM1 Proteinlevel im Vergleich zur DMSO-Probe detektiert werden. Hierbei wurde nach Quantifizierung des Western Blots (b) eine Herunterregulation von PIM1 jeweils um circa 30 % nach 48 und 54 Stunden ermittelt. Der erfolgreiche Einsatz von Cycloheximid ist sowohl im Western Blot (a) als auch im Diagramm der Quantifizierung (b) zu erkennen. Durch die Inkubation der HepG2 Zellen mit 45 μM Cycloheximid kann ebenfalls eine Verringerung des PIM1 Signals um 44 % nachgewiesen werden. Die stärkste Inhibition der PIM1 Translation ist in der Probe der Doppelbehandlung von Simvastatin und Cycloheximid zu beobachten, wobei nur noch ein schwaches PIM1 Proteinsignal detektiert werden kann, das eine Verminderung von 77 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle aufweist.

Zum Nachweis, dass die im Western Blot dargestellte Verringerung der PIM1 Proteinlevel der Cycloheximid- und Doppelbehandlungsprobe nicht aus bereits reduzierte *Pim-1* mRNA Spiegel resultieren, wurde eine RT-qPCR (c) als Kontroll-Experiment durchgeführt. Diese zeigt $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ -Werte, welche die relativen *Pim-1* mRNA Spiegel, nach Normierung auf die β -Aktin mRNA Level und die $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Werte der DMSO-Kontrolle, repräsentieren. Hierbei wird deutlich, dass die mRNA von *Pim-1* unter Simvastatin-Gabe zu beiden Zeitpunkten eine signifikante Abnahme von 57 % aufweist. Eine 6 stündige Inkubation der HepG2 Zellen mit 45 μM Cycloheximid hat einen 3,4-fachen Anstieg der *Pim-1* mRNA Spiegel zur Folge. Bei der Behandlung mit Simvastatin und Cycloheximid ist ebenfalls eine signifikante Zunahme der *Pim-1* mRNA Level zu erkennen. Diese ist zwar schwächer als die der Cycloheximid-Einzelbehandlung zeigt aber dennoch eine Hochregulation um das 2,4-fache im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Demnach sind die im Western Blot (a) detektierten geringen PIM1 Signale der Cycloheximid- und Doppelbehandlungsprobe nicht auf reduzierte *Pim-1* mRNA Spiegel zurückzuführen.

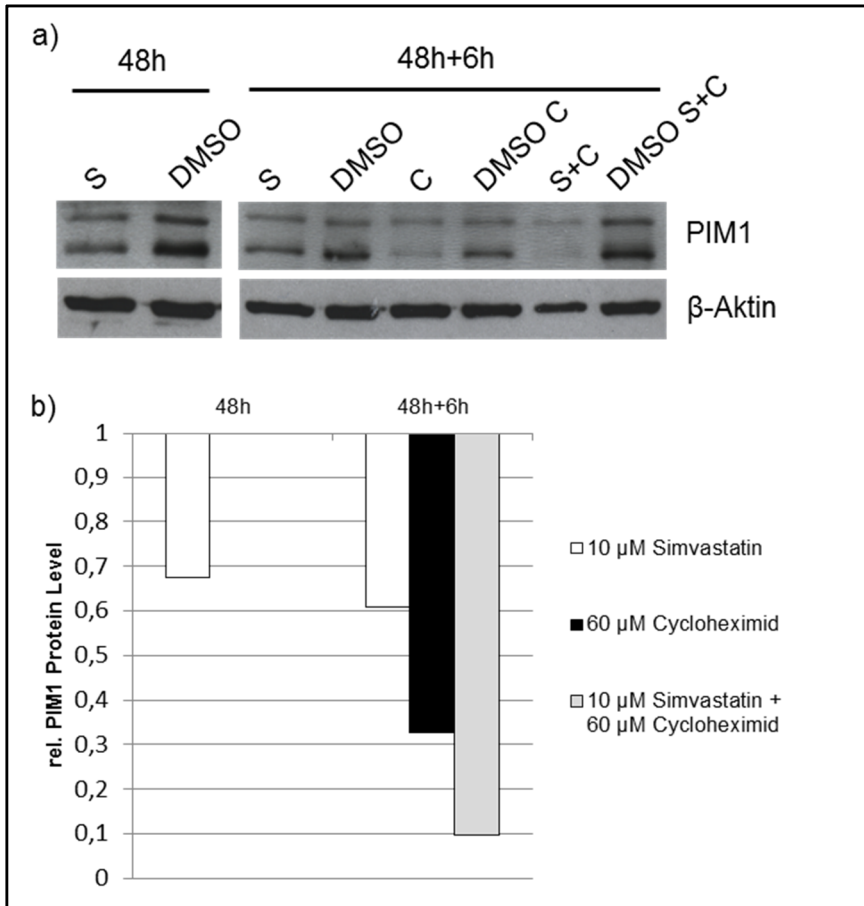


Abb.20: PIM1 Western Blot in HepG2 Zellen. Ein Teil der Zellen wurde für 48 Stunden entweder mit 10 μ M Simvastatin („S“, weiß) oder DMSO und anschließend für weitere 6 Stunden mit 10 μ M Simvastatin („S“, weiß), 60 μ M Cycloheximid („C“, schwarz) oder 10 μ M Simvastatin + 60 μ M Cycloheximid („S+C“, hellgrau) behandelt. Die Inkubation der Zellen mit DMSO erfolgte in gleichen Volumenverhältnissen entsprechend der jeweiligen Behandlung über 48 Stunden oder 48+6 Stunden. β -Aktin diente als Ladekontrolle. a) PIM1 Western Blot. Der Western Blot erfolgte unter folgenden Bedingungen: PIM1: 1:500 ÜN, m-IgG BP-HRP 1:4000 für 45 min; β -Aktin: β -Aktin AK und m-IgG BP-HRP jeweils 1:30000 für 1h 30min. b) Die Quantifizierung des Western Blots erfolgte mittels ImageJ. Die PIM1 Proteinlevel wurden normiert auf β -Aktin und DMSO.

Um zu prüfen ob sich der PIM1 Knockdown-Effekt noch verstärken lässt, wurde der in Abbildung 19 durchgeführte Western Blot mit einer höheren Konzentration Cycloheximid von 60 μ M wiederholt.

Wie bei dem vorangegangenen Western Blot ist das PIM1 Level der 10 μ M Simvastatin-Probe der Abbildung 20 nach 48 Stunden um 30 % geringer als das der DMSO-Kontrolle. Für die Statin-Behandlung nach 54 Stunden kann sogar eine Abnahme des PIM1 Proteinsignals um 40 % verzeichnet werden. Bei Betrachtung des PIM1 Proteinlevels nach einer 6 stündigen Inkubation von 60 μ M Cycloheximid ist ebenfalls eine Verringerung, gemessen an DMSO, um 67 % zu erkennen. Zudem lässt sich der

synergistische, inhibitorische Effekt von Simvastatin und Cycloheximid aus der Abbildung 19 nicht nur bestätigen, sondern wird durch die Zunahme der Cycloheximid Konzentration sogar noch verstärkt. Die PIM1 Proteinlevel der Doppelbehandlungsprobe weist hierbei eine Reduktion von 90 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle auf.

Die beiden nachfolgenden Abbildungen sollen die Untersuchungen zum Einfluss des Statin-vermittelten PIM1 Knockdowns auf die Translations-Elongation in der Dickdarmkarzinom-Zelllinie LS174T zeigen. Hierbei entsprachen das experimentelle Vorgehen und die Versuchsauswertung dem der HepG2 Leberkarzinom-Zelllinie. Lediglich die Simvastatin Konzentration wurde auf die effektive Dosis für die LS174T Zellen angepasst.

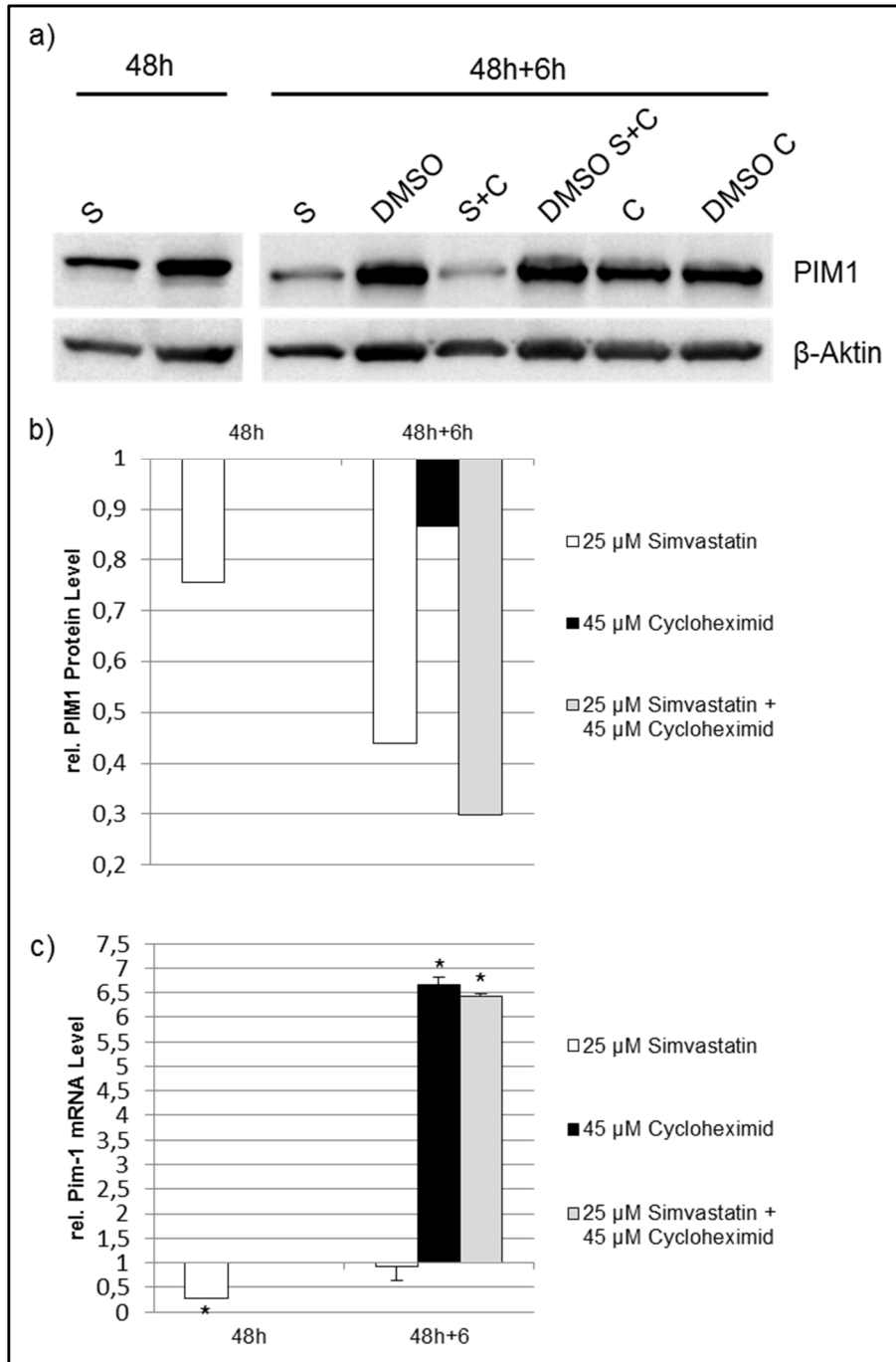


Abb.21: PIM1 Western Blot in LS174T Zellen. Ein Teil der Zellen wurde für 48 Stunden entweder mit 25 μM Simvastatin („S“, weiß) oder DMSO und anschließend für weitere 6 Stunden mit 25 μM Simvastatin („S“, weiß), 45 μM Cycloheximid („C“, schwarz) oder 25 μM Simvastatin + 45 μM Cycloheximid („S+C“, hellgrau) behandelt. Die Inkubation der Zellen mit DMSO erfolgte in gleichen Volumenverhältnissen entsprechend der jeweiligen Behandlung über 48 Stunden oder 48+6 Stunden. β-Aktin diente als Ladekontrolle. a) PIM1 Western Blot. Der Western Blot erfolgte unter folgenden Bedingungen: PIM1: 1:1000 ÜN, anti rabbit IgG-HRP 1:5000 für 40 min; β-Aktin: β-Aktin AK und m-IgG BP-HRP jeweils 1:20000 für 2h 20min. b) Die Quantifizierung des Western Blots erfolgte mittels ImageJ. Die PIM1 Proteinlevel wurden normiert auf β-Aktin und DMSO. c) RT-qPCR Experiment. Relative *Pim-1* mRNA Level nach 48 h (n=3) und 48+6 h (n=6) normiert auf β-Aktin und DMSO. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM von n unabhängigen Zellproben. Die Signifikanz der Expressionslevel ist als P-Wert folgendermaßen angegeben: *p< 0,05.

Wie bei den Versuchen der HepG2 Zellen wurde zunächst das Experiment mit der geringeren Cycloheximid Konzentration durchgeführt.

Im Western Blot (a) und dessen Quantifizierung (b) der Abbildung 21 ist zu erkennen, dass das PIM1 Proteinsignal nach einer 25 µM Simvastatin-Präinkubation von 48 Stunden nur um 24 % schwächer ist als die entsprechende DMSO-Kontrolle. Jedoch ist der Statin-vermittelte PIM1 Knockdown nach 54 Stunden mit einer Abnahme von 56 % wieder deutlich sichtbar und stärker als in den HepG2 Zellen. Nach einer 6 stündigen Cycloheximid-Behandlung der LS174T Zellen ist eine Verringerung des PIM1 Signals von 13 %, gemessen an den PIM1 Leveln der DMSO-Kontrolle, zu erkennen. Damit ist die Inhibition der Translation von PIM1 mit 45 µM Cycloheximid schwächer als in den HepG2 Zellen. Allerdings kann in den LS174T Zellen, wie bereits in der Zelllinie HepG2, die insgesamt stärkste Abnahme des PIM1 Proteinlevels nach der Doppelbehandlung von 25 µM Simvastatin und 45 µM Cycloheximid detektiert werden. Diese entspricht etwa einer Verminderung um 70 % im Vergleich zur DMSO-Probe und ist somit ähnlich stark wie in der Leberkarzinom-Zelllinie.

Wie bereits für die HepG2 Zellen wurde auch für die LS174T Zellen ein Kontroll-Experiment durchgeführt. Mit Hilfe der RT-qPCR (c) sollte der Nachweis erbracht werden, dass die geringen PIM1 Proteinlevel nach der Cycloheximid-Gabe und der Doppelbehandlung der LS174T Zellen nicht auf reduziert *Pim-1* mRNA Spiegel zurückzuführen sind. Nach einer Simvastatin-Inkubation über 48 Stunden ist eine signifikante Verringerung der *Pim-1* mRNA Level von 72 % im Vergleich zur DMSO-Probe zu erkennen, welche auch nach 54 Stunden Statin-Behandlung detektiert werden kann. Jedoch liegt hier nur eine schwache Reduktion von 8 % der *Pim-1* mRNA vor. Auf Grund der Cycloheximid-Behandlung der Zellen kommt es zur Inhibition der Translation, was zu einer 6,7-fachen, signifikanten Anreicherung der *Pim-1* mRNA führt. Anders als in den HepG2 Zellen ist das *Pim-1* mRNA Level der Doppelbehandlungsprobe dem der Cycloheximid-Einzelbehandlung annähernd gleich. Hierbei ist eine signifikante Zunahme der *Pim-1* mRNA Spiegel um das 6,4-fache im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu verzeichnen.

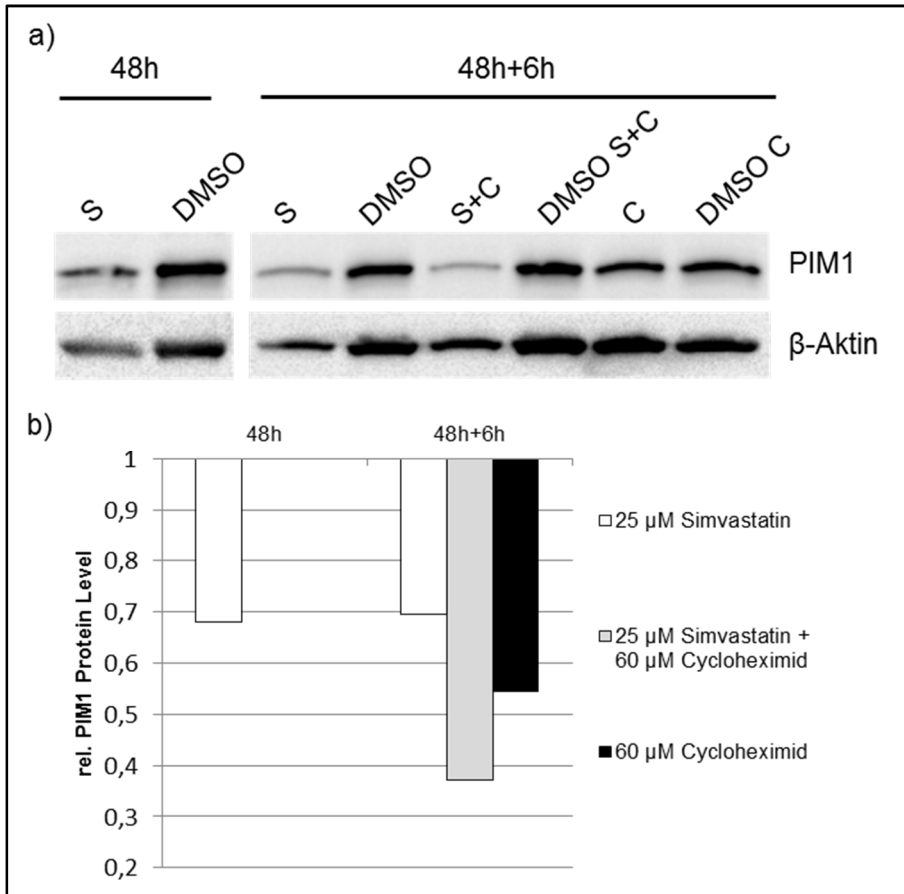


Abb.22: PIM1 Western Blot in LS174T Zellen. Ein Teil der Zellen wurde für 48 Stunden entweder mit 25 μ M Simvastatin („S“, weiß) oder DMSO und anschließend für weitere 6 Stunden mit 25 μ M Simvastatin („S“, weiß), 60 μ M Cycloheximid („C“, schwarz) oder 25 μ M Simvastatin + 60 μ M Cycloheximid („S+C“, hellgrau) behandelt. Die Inkubation der Zellen mit DMSO erfolgte in gleichen Volumenverhältnissen entsprechend der jeweiligen Behandlung über 48 Stunden oder 48+6 Stunden. β -Aktin diente als Ladekontrolle. a) PIM1 Western Blot. Der Western Blot erfolgte unter folgenden Bedingungen: PIM1: 1:1000 ÜN, anti rabbit IgG-HRP 1:5000 für 40 min; β -Aktin: β -Aktin AK und m-IgG BP-HRP jeweils 1:20000 für 1h 30min. b) Die Quantifizierung des Western Blots erfolgte mittels ImageJ. Die PIM1 Proteinlevel wurden normiert auf β -Aktin und DMSO.

Auch in den LS174T Zellen wurde die Cycloheximid Konzentration auf 60 μ M erhöht um eine mögliche Verstärkung des Einzeleffektes und des synergistischen Effektes der Doppelbehandlung von Simvastatin und Cycloheximid nachweisen zu können. Die Inkubation von 25 μ M Simvastatin für 48 und 54 Stunden zeigt eine Verringerung der PIM1 Proteinmenge um jeweils ungefähr 30 % im Vergleich zu DMSO. Die verstärkte inhibitorische Wirkung von Cycloheximid, mit einer Konzentration von 60 μ M, auf die PIM1 Translation wird in Abbildung 22 deutlich. Nach 6 Stunden Cycloheximid-Behandlung der LS174T Zellen ist eine Abnahme der PIM1 Proteinlevel, verglichen mit der DMSO-Kontrolle, von 46 % zu verzeichnen. Das insgesamt schwächste PIM1

Proteinsignal lässt sich, wie in den drei Western Blots zuvor (Abb.19-21), nach der Doppelbehandlung der Zellen mit Simvastatin und Cycloheximid mit einer Reduktion von 63 % im Vergleich zur DMSO-Probe detektieren.

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus den Experimenten zur Inhibition der Translations-Elongation aus den Abbildungen 19-22 wurde für die Analyse des Einflusses von Simvastatin auf die Translation das *metabolic labeling* zur Bestimmung der Proteinneusynthese herangezogen.

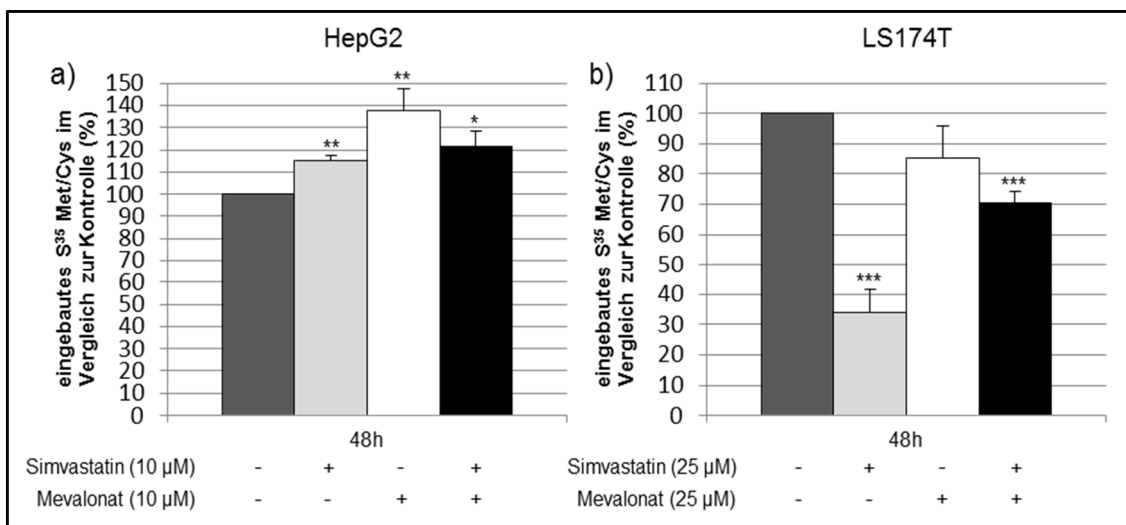


Abb.23: *Metabolic labeling* durchgeführt von Christin Müller (AG Ziebuhr der Justus-Liebig-Universität Gießen) in a) HepG2 Zellen (n=3) und b) LS174T Zellen (n=4). Die Präinkubation der Zellen mit den Zusätzen Simvastatin (hellgrau), Mevalonat (weiß), Simvastatin + Mevalonat (schwarz) oder DMSO (dunkelgrau) in IMDM Medium erfolgte jeweils über 48 Stunden. Anschließend wurde dieses Medium gegen Methionin/Cystein-freies DMEM Medium mit den entsprechenden Zusätzen ausgetauscht und für eine 1 Stunde inkubiert, bevor ein erneuter Wechsel des DMEM Mediums mit S³⁵ Methionin/Cystein und den entsprechenden Zusätzen und die Inkubation über eine weitere Stunde erfolgte. Zur Analyse der Proben wurden diese in gleicher Konzentration auf ein 12 %iges SDS-Gel geladen. Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Gel für 2 Stunden mit Coomassie-Färbelösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,01 % Coomassie Brilliant Blue R-250) inkubiert, mit 10 % Essigsäure wieder entfärbt, für 1 Stunde fixiert (30 % Methanol, 5 % Ethanol, 5 % Glycerol) und über einen Zeitraum von 1 Stunde bei 80°C getrocknet. Abschließend wurde das Gel im Phosphorimager Typhoon 9200 (Amersham) ausgelesen und mit Hilfe der Quantity One Software (BioRad) ausgewertet. Die Normierung der Werte erfolgte mittels Proteinkonzentration. Die Daten wurden in Relation zur DMSO-Kontrolle gesetzt und repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von n unabhängigen Zellproben, deren Signifikanz als P-Wert folgendermaßen angegeben ist: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

Das in Abbildung 23 dargestellte *metabolic labeling* zeigt die bei der Translation integrierte Menge des S^{35} Isotopes von Methionin, die Startaminosäure jedes neu gebildeten Proteins, beziehungsweise Cystein in die Peptidkette der (a) HepG2 Zellen und (b) LS174T Zellen. Der Einbau dieser radioaktiv markierten Aminosäuren erfolgte nach einer 48 stündigen Präinkubation von jeweils Simvastatin, Mevalonat, Simvastatin und Mevalonat oder DMSO. Diese Zusätze wurden ebenso dem Medium mit S^{35} Methionin/Cystein hinzugefügt, sodass der Einfluss von Simvastatin auf die Proteinneusynthese analysiert werden konnte.

Mit Hilfe des Diagramms aus Abbildung 23 (a) der HepG2 Zellen kann beobachtet werden, dass nach 48 Stunden die Menge an gelabeltem Gesamtprotein für die Simvastatin-, Mevalonat und Doppelbehandlungsproben signifikant höher ist als die der DMSO-Kontrolle.

Abweichend stellt es sich für die Dickdarmkrebs-Zelllinie LS174T (b) dar. Hier kann eine signifikante Reduktion des S^{35} Gesamtproteins von 66 % nach 48 Stunden Simvastatin-Gabe detektiert werden. Erwartungsgemäß ist für die Proben der Mevalonat- und Doppelbehandlung nach 48 Stunden eine Zunahme translatierten Proteins im Vergleich zur Simvastatin-Einzelbehandlung nachzuweisen. So ist eine ungefähre Verdopplung der S^{35} gelabelten Proteinmenge nach einer Inkubation von 25 μ M Simvastatin und 25 μ M Mevalonat zu erkennen. Dieses Ergebnis weist auf Grund des berechneten P-Wertes von $< 0,001$ eine ebenfalls hohe Signifikanz auf. Ebenfalls kann die Aufhebung des Statin-Effektes durch Mevalonat beobachtet werden. Die Menge an gelabeltem Gesamtprotein ist mit 85 % um 51 % höher als die der Simvastatin-behandelten Probe.

3.1.4 Analyse des Statin-vermittelten PIM1 Knockdowns auf posttranslationeller Ebene hinsichtlich des Proteinabbaus

Über die PIM1 Kinase ist bekannt, dass es sich hierbei um ein kurzlebige Protein handelt [55], dessen schneller Abbau im Proteasom durch Ubiquitylierung [46] oder Sumoylierung [76] eingeleitet wird. Weiterhin besteht auch die Vermutung, dass PIM1 möglicherweise im Lysosom degradiert werden kann (1.3.4) [46, 82]. Aus diesem Grund wurde die hemmende Wirkung von Simvastatin auf die Regulation der Sumoylierung von PIM1, sowie auf dessen proteasomalen und lysosomalen Abbau untersucht.

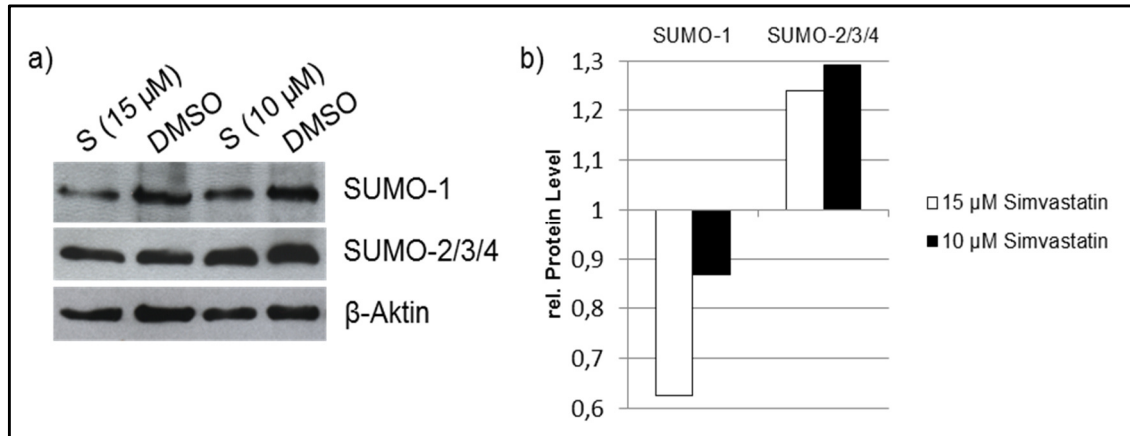


Abb.24: Western Blot in HepG2 Zellen zum Nachweis von SUMO-1 und SUMO-2/3/4. Ein Teil der Zellen wurde für 48 Stunden entweder mit 10 µM Simvastatin („S“, schwarz), 15 µM Simvastatin („S“, weiß) oder DMSO behandelt. Die Inkubation der Zellen mit DMSO erfolgte in gleichen Volumenverhältnissen entsprechend der jeweiligen Simvastatin-Behandlung. β-Aktin diente als Ladekontrolle. a) Western Blot. Der Western Blot erfolgte unter folgenden Bedingungen: SUMO-1: 1:500 ÜN, m-IgG BP-HRP 1:4000 für 1h 30min; SUMO-2/3/4: 1:500 ÜN, m-IgG BP-HRP 1:4000 für 1h 30min; β-Aktin: β-Aktin AK und m-IgG BP-HRP jeweils 1:30000 für 2h 10min. b) Die Quantifizierung des Western Blots erfolgte mittels ImageJ. Die Proteinlevel wurden normiert auf β-Aktin und DMSO.

Der in Abbildung 24 dargestellte Western Blot zeigt die Detektion der SUMO-Proteine eins bis vier. Die Proteine SUMO-2,-3 und -4 ließen sich dabei mit Hilfe eines Antikörpers nachweisen. Generell fungieren diese Proteine in ähnlicher Weise wie Ubiquitin und dienen unter anderem als Markierung für den Proteinabbau. Somit wäre für einen, über die Sumoylierung regulierten, Simvastatin-vermittelten Knockdown von PIM1 ein Anstieg der Level dieser SUMO-Proteine zu erwarten.

Wie aus diesem Western Blot in Abbildung 24 (a) und (b) ersichtlich wird, trifft dies nicht auf SUMO-1 zu, denn hier sind die Proteinsignale nach 48 Stunden Inkubation mit 15 µM oder 10 µM Simvastatin jeweils 37 % und 13 % geringer als die der dazugehörigen DMSO-Probe. Jedoch ist nach der Quantifizierung des Western Blots für die Proteine SUMO-2,-3,-4 zu erkennen, dass mit 15 µM oder 10 µM Simvastatin-Behandlung diese Proteinlevel im Vergleich zu DMSO jeweils um das 1,24-fache und das 1,29-fache erhöht sind.

In den nächsten beiden Experimenten der HepG2 und LS174T Zellen sollte mit Hilfe des Inhibitors Bortezomib analysiert werden ob Simvastatin den Abbau von PIM1 im Proteasom beeinflusst. Dazu wurde jeweils ein Western Blot mit den Proben der beiden Zelllinien durchgeführt und die Proteinsignale quantitativ ausgewertet. Zur Kontrolle, dass die detektierten Proteinsignale von PIM1 nicht aus den mRNA Leveln resultieren,

erfolgte die Behandlung der Zellen für das RT-qPCR Experiment nach gleicher Vorgehensweise wie für die Proben des Western Blots. Zudem entsprach der experimentelle Ablauf der Zellbehandlungen für den Western Blot und der RT-qPCR dem der Versuche mit Cycloheximid.

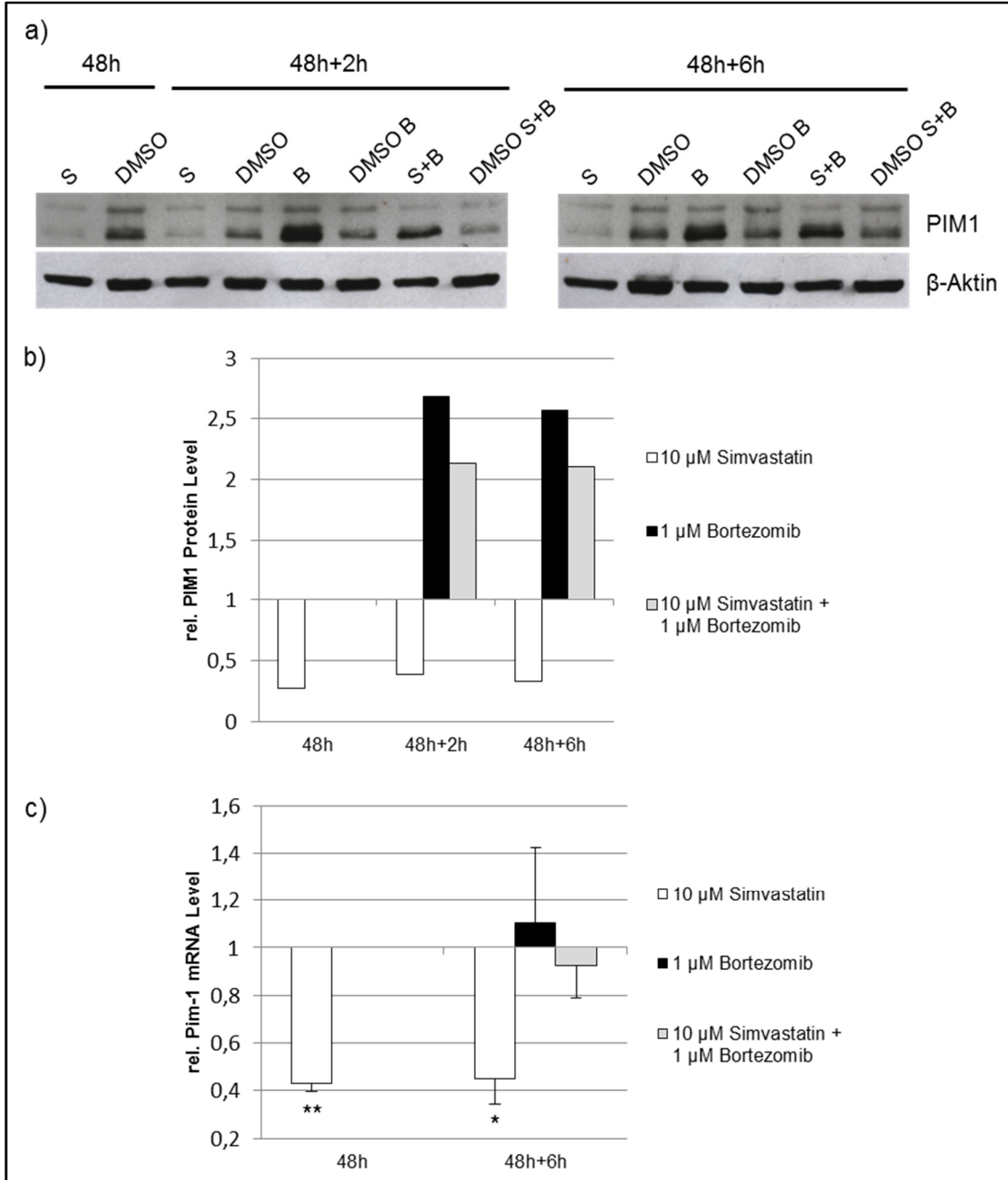


Abb.25: PIM1 Western Blot in HepG2 Zellen. Ein Teil der Zellen wurde für 48 Stunden entweder mit 10 μ M Simvastatin („S“, weiß) oder DMSO und anschließend für weitere 6 Stunden mit 10 μ M Simvastatin („S“, weiß), 1 μ M Bortezomib („B“, schwarz) oder 10 μ M Simvastatin + 1 μ M Bortezomib („S+B“, hellgrau) behandelt. Die Inkubation der Zellen mit DMSO erfolgte in gleichen Volumenverhältnissen entsprechend der jeweiligen Behandlung über 48 Stunden oder 48+6 Stunden. β -Aktin diente als Ladekontrolle. a) PIM1

Western Blot. Der Western Blot erfolgte unter folgenden Bedingungen: PIM1: 1:500 ÜN, anti mouse IgG-HRP 1:5000 für 45 min; β -Aktin: β -Aktin AK und m-IgG BP-HRP jeweils 1:30000 für 2h. b) Die Quantifizierung des Western Blots erfolgte mittels ImageJ. Die PIM1 Proteinlevel wurden normiert auf β -Aktin und DMSO. c) RT-qPCR Experiment. Relative *Pim-1* mRNA Level nach 48 h (n=3) und 48+6 h (n=3) normiert auf β -Aktin und DMSO. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von n unabhängigen Zellproben. Die Signifikanz der Expressionslevel ist als P-Wert folgendermaßen angegeben: *p< 0,05, **p< 0,01.

Bortezomib ist ein Inhibitor des eukaryotischen 26S-Proteasoms, wodurch der Abbau von Proteinen [46], in diesem Fall von PIM1, verhindert wird und zur Anreicherung in der Zelle führt.

In Abbildung 25 (a) und (b) kann erneut eine Simvastatin-vermittelte Reduktion der PIM1 Proteinlevel von etwa 61 bis 73 % sowie eine signifikante Verringerung der *Pim-1* mRNA Spiegel (c) von über 50 % über einen Behandlungszeitraum von 48 bis 54 Stunden beobachtet werden. Wie erwartet, kommt es zu einer enormen Anreicherung des PIM1 Proteinsignals um das 2,7-fache nach 2 Stunden und das 2,6-fache nach 6 Stunden Inkubation der HepG2 Zellen mit 1 μ M Bortezomib im Vergleich zur DMSO-Probe. Nach einer 6 stündigen Bortezomib-Gabe deutet sich eine schwache, 0,1-fache Hochregulation der *Pim-1* mRNA Level an. Auf Grund von Schwankungen der einzelnen Bortezomib-behandelten Proben, kommt es zu einer Standardabweichung von 0,32, sodass ein gleichbleibender mRNA Spiegel dieser Proben im Bezug auf die DMSO-Kontrolle angenommen werden kann. Für die 2 und 6 Stunden-Proben der Doppelbehandlung von Simvastatin und Bortezomib ist auch eine Zunahme des PIM1 Proteinsignals um jeweils das 2,1-fache, gemessen an DMSO, zu erkennen. Die dazugehörigen *Pim-1* mRNA Level lassen eine geringe Herunterregulation vermuten. Da diese Reduktion jedoch nur 8 % beträgt und die Proben ebenfalls eine hohe Standardabweichung von 0,13 aufweisen, ist auch hier nicht auszuschließen, dass die *Pim-1* mRNA Spiegel der Doppelbehandlung zur DMSO-Kontrolle unverändert sind.

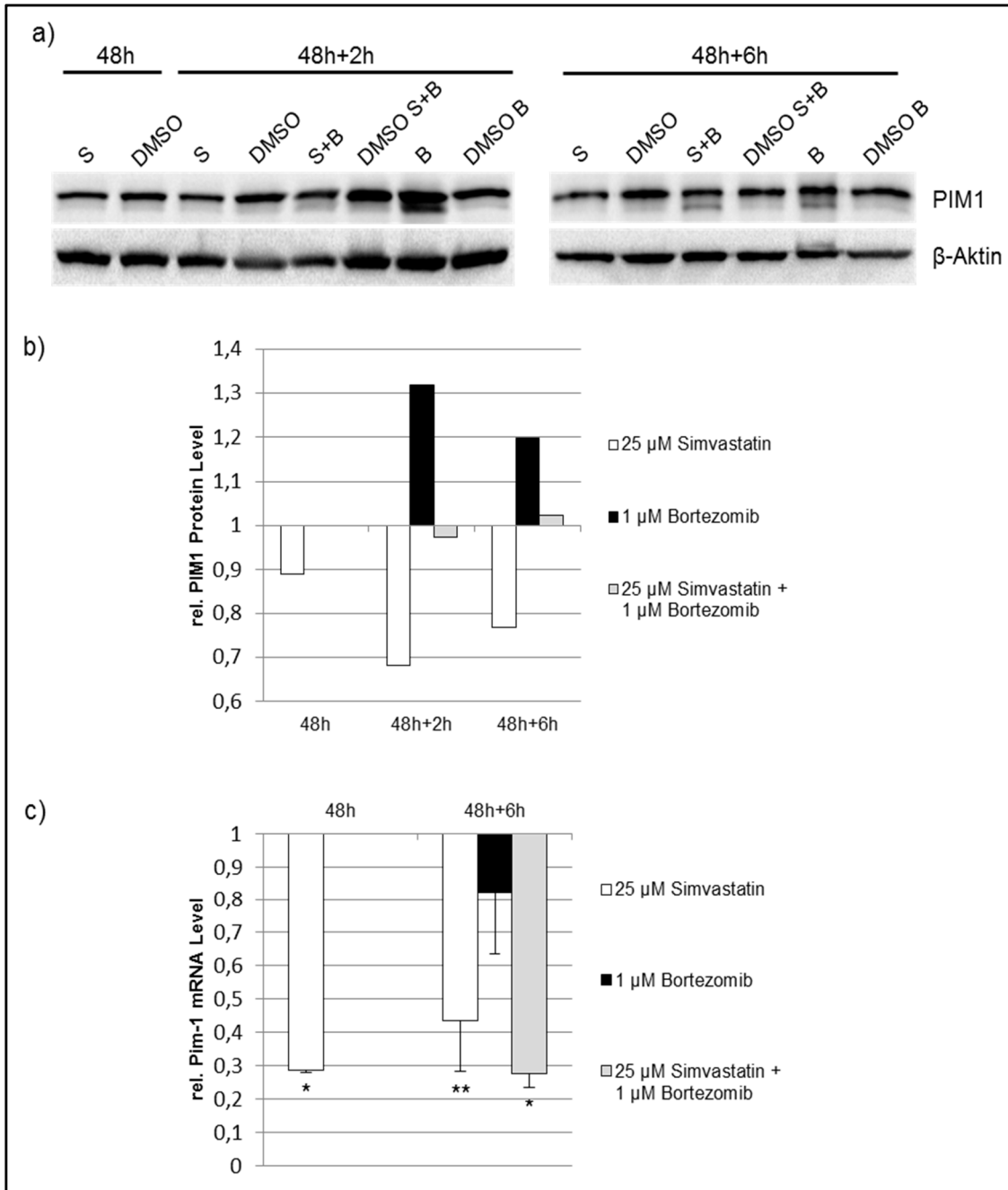


Abb.26: PIM1 Western Blot in LS174T Zellen. Ein Teil der Zellen wurde für 48 Stunden entweder mit 25 μ M Simvastatin („S“, weiß) oder DMSO und anschließend für weitere 6 Stunden mit 25 μ M Simvastatin („S“, weiß), 1 μ M Bortezomib („B“, schwarz) oder 25 μ M Simvastatin + 1 μ M Bortezomib („S+B“, hellgrau) behandelt. Die Inkubation der Zellen mit DMSO erfolgte in gleichen Volumenverhältnissen entsprechend der jeweiligen Behandlung über 48 Stunden oder 48+6 Stunden. β -Aktin diente als Ladekontrolle. a) Western Blot. Der Western Blot erfolgte unter folgenden Bedingungen: PIM1: 1:1000 ÜN, anti rabbit IgG-HRP 1:5000 für 40 min; β -Aktin: β -Aktin AK und m-IgG BP-HRP jeweils 1:20000 für 2h. b) Die Quantifizierung des Western Blots erfolgte mittels ImageJ. Die PIM1 Proteinlevel wurden normiert auf β -Aktin und DMSO. c) RT-qPCR Experiment. Relative *Pim-1* mRNA Level nach 48 h (n=3) und 48+6 h (n=3) normiert auf β -Aktin und DMSO. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von n unabhängigen Zellproben. Die Signifikanz der Expressionslevel ist als P-Wert folgendermaßen angegeben: *p < 0,05, **p < 0,01.

Die Behandlung der LS174T Zellen des Western Blots der Abbildung 26 (a) und der RT-qPCR (c) erfolgte in gleicher Weise wie für die HepG2 Proben der Abbildung 25. Lediglich die Simvastatin-Konzentration wurde mit 25 μ M der Zelllinie angepasst.

Die PIM1 Signale der Simvastatin-Proben nach 48, 50 und 54 Stunden zeigen, anders als im Experiment der HepG2 Zellen, nur eine leichte Reduktion von jeweils 11 %, 32 % und 23 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die dazugehörigen mRNA Spiegel von *Pim-1* weisen hingegen eine 71 %ige, signifikante Reduktion nach 48 Stunden und eine Abnahme von 66 %, mit einer Signifikanz von 0,01, nach 54 Stunden auf. Für die Proteinlevel von PIM1 nach 2 und 6 Stunden Bortezomib-Gabe ist jeweils eine Zunahme um das 1,32-fache und 1,2-fache im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Probe zu erkennen. Somit ist die Anreicherung der PIM1 Kinase durch den Proteasom-Inhibitor ebenfalls schwächer als zuvor in den HepG2 Zellen. Hier deutet sich für die LS174T Zellen nach einer 6 stündigen Bortezomib-Behandlung eine Abnahme der *Pim-1* mRNA Spiegel von 18 % an. Da die Mittelwerte dieser Proben großen Abweichungen unterliegen, ergibt sich eine Standardabweichung von 0,18. Die PIM1 Proteinlevel erscheinen nach einer 6 stündigen Doppelbehandlung der Zellen um das 0,25-fache leicht hochreguliert im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle, wohingegen sich nach 2 Stunden eine geringe Herunterregulation des PIM1 Proteinsignals von 3 % andeutet. Die *Pim-1* mRNA Level der LS174T Zellen sind nach einer Inkubation mit Simvastatin und Bortezomib signifikant um 73 % verringert.

Um zu prüfen ob der Statin-Effekt möglicherweise mit einem lysosomalen Abbau von PIM1 einhergeht, wurden HepG2 Zellen nach 48 Stunden einer Simvastatin-Präinkubation mit verschiedenen Substanzen, die den Proteinabbau im Lysosom inhibieren, versetzt. Anschließend wurden die Proben in einem Western Blot analysiert und die Proteinsignale quantitativ ausgewertet.

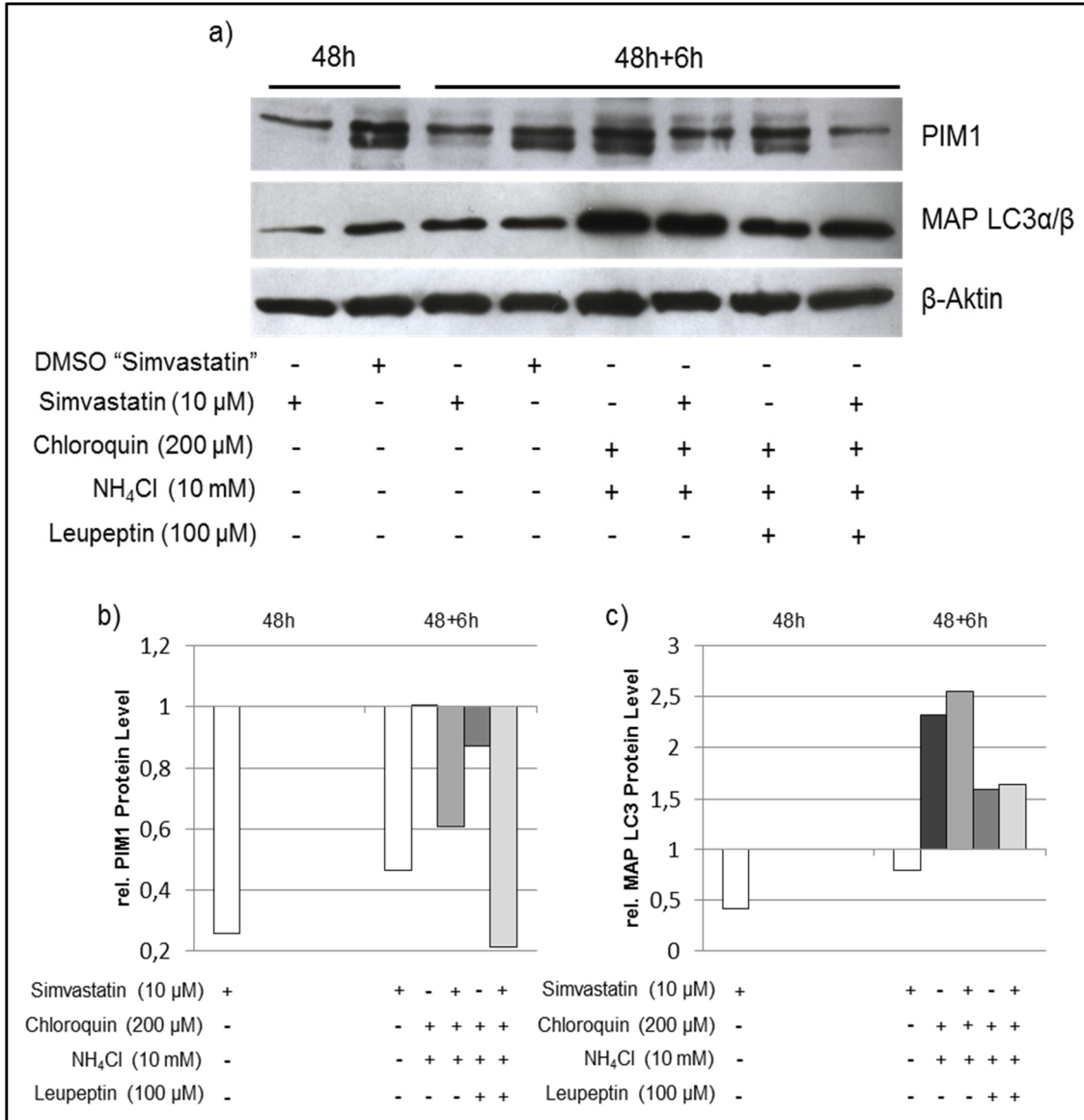


Abb.27: Western Blot in HepG2 Zellen zum Nachweis von PIM1 und MAP LC3α/β. Ein Teil der Zellen wurde für 48 Stunden entweder mit 10 μM Simvastatin („S“, weiß) oder DMSO und anschließend für weitere 6 Stunden mit 10 μM Simvastatin („S“, weiß), verschiedenen lysosomalen, inhibitorischen Substanzen (dunkelgrau) oder 10 μM Simvastatin + verschiedenen lysosomalen, inhibitorischen Substanzen (hellgrau) behandelt. Die Inkubation der Zellen mit DMSO erfolgte in gleichen Volumenverhältnissen entsprechend der Simvastatin-Behandlung über 48 Stunden und 48+6 Stunden. β-Aktin diente als Ladekontrolle. a) Western Blot. Der Western Blot erfolgte unter folgenden Bedingungen: PIM1: 1:1000 ÜN, anti rabbit IgG-HRP 1:3000 für 1 h; MAP LC3α/β: 1:1000 ÜN, m-IgG BP-HRP 1:4000 für 1h 40min; β-Aktin: β-Aktin AK und m-IgG BP-HRP jeweils 1:30000 für 2h 30min. b) Quantifizierung des PIM1 Western Blots. c) Quantifizierung des MAP LC3α/β Western Blots. Die Quantifizierung erfolgte jeweils mittels ImageJ. Die Proteinlevel wurden normiert auf β-Aktin und DMSO.

MAP LC3α/β (*microtubule-associated protein light chain 3α/β*) sind Membranproteine des Autophagosoms, welches mit dem Lysosom zu einem sogenannten Autolysosom

fusioniert [158]. Kommt es zum lysosomalen Abbau, so werden diese Proteine ebenfalls degradiert und können nicht länger detektiert werden [159]. Um den Proteinabbau des Lysosoms zu blockieren, können verschiedene Inhibitoren eingesetzt werden. So neutralisiert Ammoniumchlorid (NH_4Cl) den pH-Wert des Lysosoms und Leupeptin verhindert den Abbau von Proteinen durch Inhibition der Serin-, Cystein-Proteasen. Zudem blockiert Chloroquin die lysosomale DNase, welches standardmäßig für Versuche zur Hemmung des lysosomalen Abbaus eingesetzt wird [134].

Wie aus dem Western Blot der Abbildung 27 hervorgeht, ist PIM1 nach 48 und 54 Stunden Simvastatin-Gabe stark herunterreguliert im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Interessanterweise ist für MAP LC3 α/β etwa eine Halbierung der Proteinmenge nach einer 48 stündigen Behandlung der Zellen mit Statin zu erkennen. Diese Reduktion des Proteinsignals kann für die 54 Stunden-Proben nicht mehr detektiert werden und liegt nur noch bei 21 % verglichen mit der entsprechenden DMSO-Kontrolle, was darauf hinweisen könnte, dass Statine ebenfalls den lysosomalen Abbau fördern. Die PIM1 Proteinlevel liegen nach der 6 stündigen Zugabe beider Kombinationen lysosomaler Inhibitoren (Chloroquin + Ammoniumchlorid und Chloroquin + Ammoniumchlorid + Leupeptin) nur ungefähr im Bereich der DMSO-Proben oder scheinen mit 13 % hierzu etwas herunterreguliert zu sein. Zudem kann eine starke Abnahme der PIM1 Level im Bereich von 39 bis 79 % für die Proben mit Simvastatin und Inhibitoren detektiert werden, im Vergleich zu denen, die nur mit lysosomalen Inhibitoren inkubiert wurden. Dass der lysosomale Abbau blockiert ist, kann durch eine generelle Zunahme der MAP LC3 α/β Level für alle mit den Inhibitoren behandelten Proben beobachtet werden. Die Proben, die einer alleinigen Inkubation mit den inhibitorischen Substanzen unterlagen, ist ein 1,6- bis 2,3-facher Anstieg dieser Proteinlevel zu erkennen. Für die MAP LC3 α/β Level jener Proben, die sowohl mit lysosomalen Inhibitoren als auch mit Simvastatin behandelt wurden, deutet sich ein leichter 0,04- bis 0,25-facher Anstieg im Vergleich zu den Proben nach einer Einzelbehandlung mit den lysosomalen Inhibitoren an.

3.2 Analyse der Funktion von PIM1 in primären Zellen

Zur Aufklärung der Funktion der PIM1 Kinase in primären Zellen wurde diese in Monozyten und Makrophagen verschiedener Blutspender auf mRNA- und Proteinebene analysiert. Dabei lag der Fokus auf den Differenzierungsprozess der Monozyten zu Makrophagen. Der Hauptregulationsweg hierfür ist der JAK/STAT-Signalweg [107], welcher unter anderem durch die Cytokine Interferon- γ (INF γ) und GM-CSF (*granulocyte-macrophage-colony stimulating factor*) ausgelöst wird. Es konnte gezeigt werden, dass diese Signalkaskade zur Induktion der *Pim-1* Transkription in Monozyten

führt [114]. Zudem ist bekannt, dass PIM1 bei der Differenzierung von Krebszellen involviert ist [54].

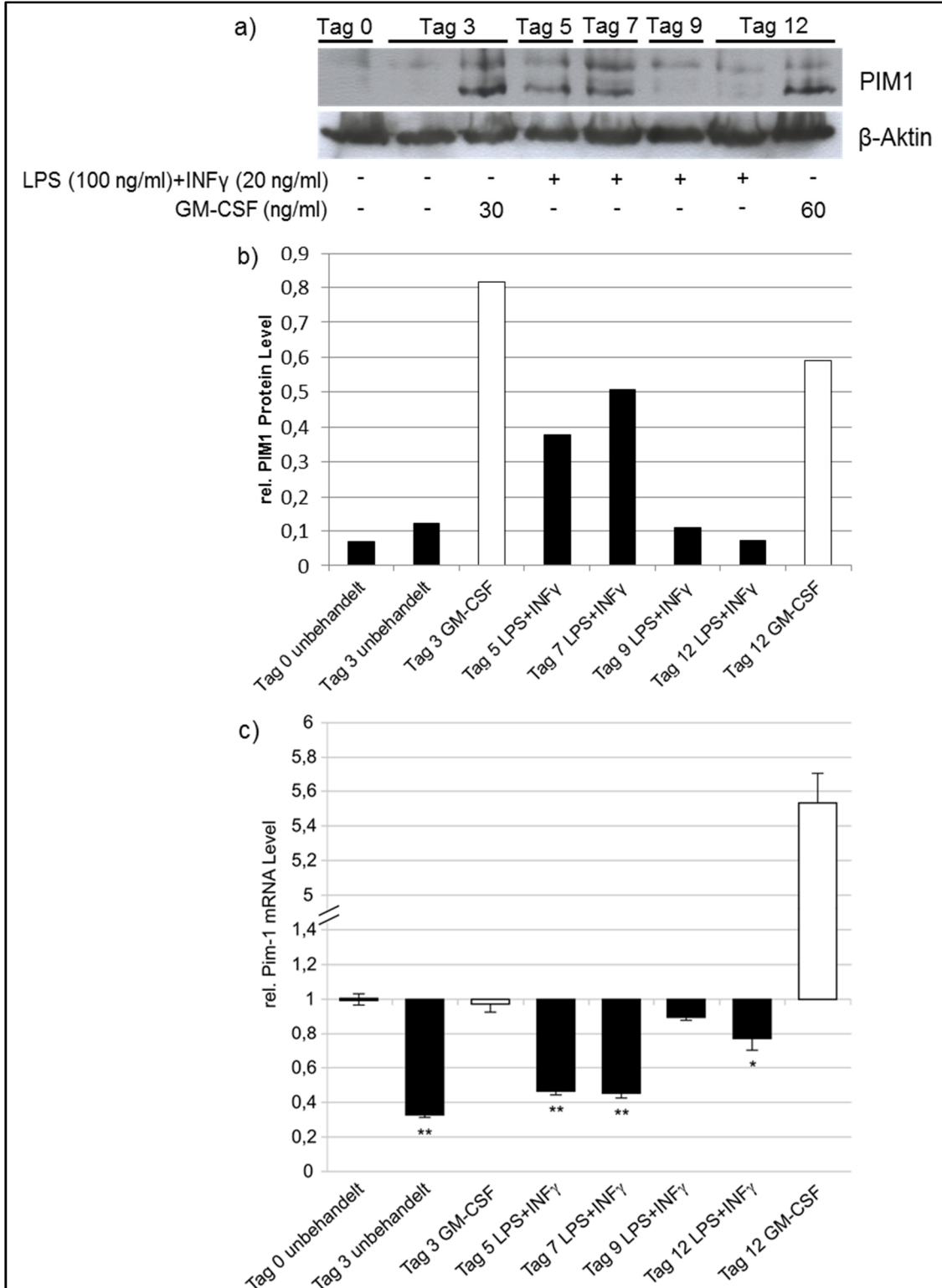


Abb.28: Monozyten/ Makrophagen des Spenders 1. Ein Teil der Zellen wurde an Tag 0 für einen Zeitraum von 3 oder 12 Tagen entweder mit 30 ng/ml GM-CSF beziehungsweise 60 ng/ml GM-CSF (weiß) oder 18

Stunden vor Zellernte über den Zeitraum von 5 bis 12 Tagen mit 100 ng/ml LPS + 20 ng/ml INF γ (schwarz) behandelt. a) PIM1 Western Blot. Der Western Blot erfolgte unter folgenden Bedingungen: PIM1: 1:1000 ÜN, goat anti mouse IgG-HRP 1:4000 für 1h 25min; β -Aktin: β -Aktin AK und goat anti mouse IgG-HRP jeweils 1:15000 für 1h 30min. β -Aktin diente als Ladekontrolle. b) Die Quantifizierung des Western Blots erfolgte mittels ImageJ. Die PIM1 Proteinlevel wurden normiert auf β -Aktin. c) RT-qPCR Experiment. Relative *Pim-1* mRNA Level an Tag 3 (jeweils n=3), Tag 5 (n=3), Tag 7 (n=3), Tag 9 (n=3), Tag 12 mit LPS + INF γ (n=3) und Tag 12 mit GM-CSF (n=2) normiert auf β -Aktin und Tag 0 Monozyten (unbehandelt) (n=3). Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von n unabhängigen Zellproben. Die Signifikanz der Expressionslevel ist als P-Wert folgendermaßen angegeben: *p< 0,05, **p< 0,01.

Die in Abbildung 28 dargestellten Experimente zeigen die mRNA und Proteinlevel der PIM1 Kinase der Monozyten und Makrophagen des Blutspenders 1 über den Zeitraum von 12 Tagen. Hierfür wurde ein Teil der Monozyten am Tag der Präparation (Tag 0) mit GM-CSF über 3 und 12 Tage behandelt. GM-CSF ist ein Kolonie-stimulierender Faktor aus der Gruppe der Cytokine, der zur Makrophagen Stimulation des Typs M1 führt. Der übrige Teil der Monozyten und Makrophagen wurde jeweils 18 Stunden vor Zellernte mit einer Kombination aus Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon- γ (INF γ) behandelt, wodurch es zur Aktivierung der Makrophagen kommt [108]. Zur Einschätzung der Auswirkungen der verschiedenen Substanzen auf die Expression der PIM1 Kinase in Monozyten und Makrophagen, wurden am Tag 0 ebenso unbehandelte Monozyten geerntet und auf mRNA- und Proteinebene untersucht.

Wie aus dem Western Blot (a) und dessen Quantifizierung (b) in Abbildung 28 hervorgeht, ist das PIM1 Proteinsignal an Tag 0 sehr schwach. Die mRNA Level der unbehandelten Tag 0 Monozyten wurden zur Normierung für die RT-qPCR (c) der anderen Proben herangezogen. Die ebenfalls unbehandelten Tag 3-Proben zeigen im Vergleich zu Tag 0 nur eine geringe Zunahme der PIM1 Proteinlevel. Die mRNA Level sind hier signifikant um 68 % herunterreguliert, verglichen mit den Monozyten an Tag 0. Im Gegensatz dazu bewirkt eine GM-CSF-Behandlung von 30 ng/ml über 3 Tage eine circa 8-fache Zunahme der PIM1 Proteinlevel im Verhältnis zu den unbehandelten Tag 0-Proben. Die *Pim-1* mRNA Spiegel entsprechen hierbei, mit einem Wert von 0,97, annähernd denen an Tag 0. Für die Proben vom Tag 5 und Tag 7, welche einer 18 stündigen Doppelbehandlung mit LPS und INF γ unterzogen wurden, kann jeweils eine PIM1 Proteinmenge von ungefähr 0,4 und 0,5 detektiert werden. Diese liegen somit zwar über dem PIM1 Level der unbehandelten Tag 0- und Tag 3-Proben, sind aber geringer als die an Tag 3 mit GM-CSF-Behandlung. Die *Pim-1* mRNA Spiegel beider Proben weisen eine signifikante Abnahme im Bereich von 55 % auf und liegen ebenfalls unter dem Wert der mit GM-CSF behandelten Tag 3-Probe. An Tag 9 fallen die Proteinlevel von PIM1 nach der Doppelbehandlung wieder stark ab und liegen etwa bei 0,1. Auch die

Pim-1 mRNA Spiegel zeigen nur noch eine Reduktion von 11 %. Beim Vergleich der Tag 12-Proben mit GM-CSF oder LPS + $\text{INF}\gamma$ Behandlung kann auf Proteinebene für die Probe der Doppelbehandlung nur noch ein PIM1 Signal detektiert werden, dass dem der unbehandelten Tag 0-Probe entspricht, wohingegen das PIM1 Level der Makrophagen mit einer 60 ng/ml GM-CSF-Behandlung ungefähr 6-fach höher liegt als das der Proben an Tag 0 und der Doppelbehandlung. Die *Pim-1* mRNA Spiegel der Doppelbehandlung sind wie bei den anderen Proben nach LPS + $\text{INF}\gamma$ Behandlung verringert, verglichen mit den unbehandelten Tag 0 Monozyten. Hier kann eine signifikante Abnahme von 23 % ermittelt werden. Jedoch wird für die GM-CSF-Probe eine circa 5,5-fache Zunahme der *Pim-1* mRNA Level deutlich.

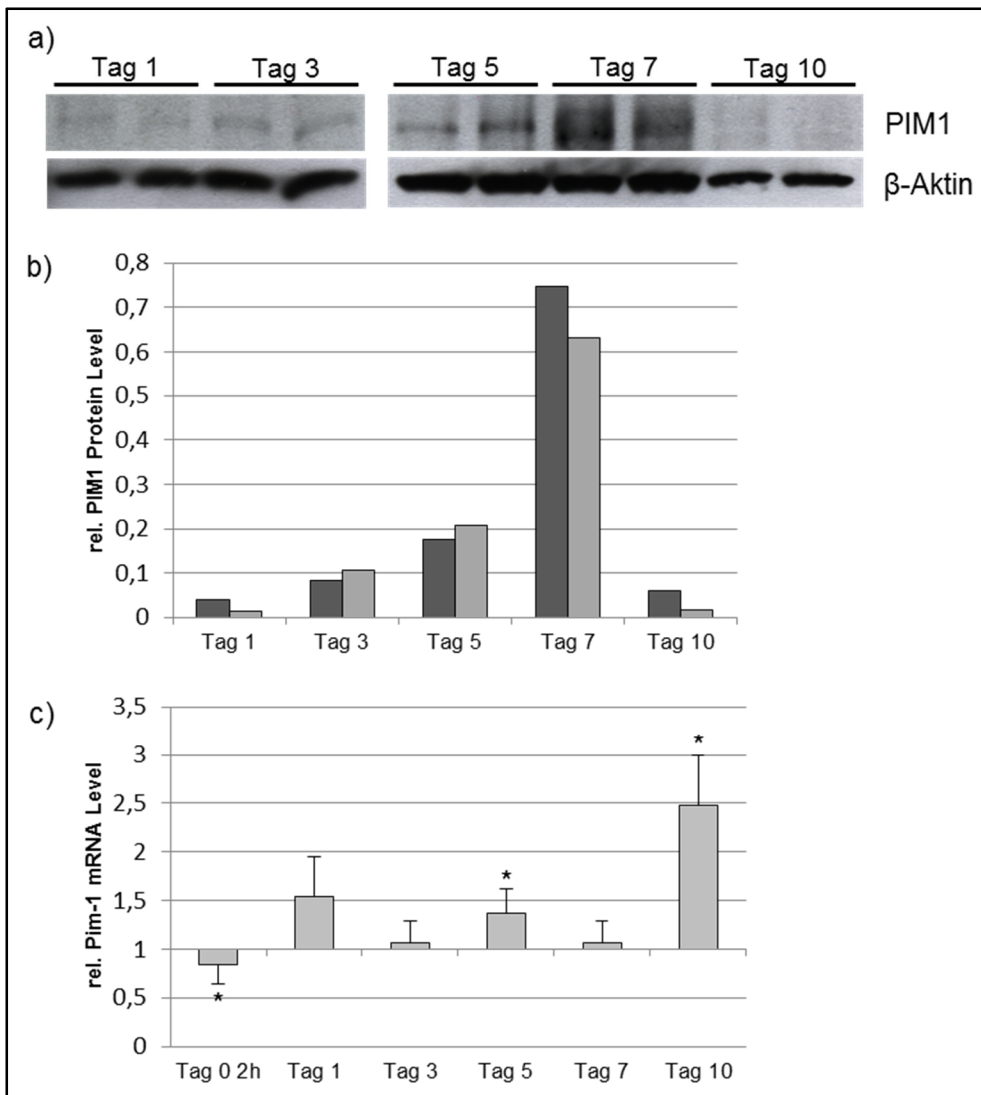


Abb.29: Monozyten/ Makrophagen des Spenders 2. Die Zellen wurden an Tag 0 für einen Zeitraum von 10 Tagen mit 10 ng/ml GM-CSF behandelt. a) PIM1 Western Blot. Die a-Proben sind in dunkelgrau und die b-Proben in hellgrau dargestellt. Der Western Blot erfolgte unter folgenden Bedingungen: PIM1: 1:1000 ÜN,

goat anti mouse IgG-HRP 1:4000 für 1h; β -Aktin: β -Aktin AK und goat anti mouse IgG-HRP jeweils 1:20000 für 1h 50min. β -Aktin diente als Ladekontrolle. b) Die Quantifizierung des Western Blots erfolgte mittels ImageJ. Die PIM1 Proteinlevel wurden normiert auf β -Aktin. c) RT-qPCR Experiment. Relative *Pim-1* mRNA Level an Tag 0 2h (n=4), Tag 1 (n=3), Tag 3 (n=3), Tag 5 (n=3), Tag 7 (n=3) und Tag 10 (n=3) normiert auf β -Aktin und Tag 0 Monozyten (unbehandelt) (n=4). Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von n unabhängigen Zellproben. Die Signifikanz der Expressionslevel ist als P-Wert folgendermaßen angegeben: *p < 0,05.

Die Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse des Western Blots (a), dessen Quantifizierung (b) und der RT-qPCR (c) des Blutspenders 2. Die Monozyten und Makrophagen dieses Spenders wurden über einen Zeitraum von 10 Tagen mit 10 ng/ml GM-CSF behandelt um die Monozyten zu M1 Makrophagen zu differenzieren und den weiteren Einfluss dieses Kolonie-stimulierenden Faktors auf Makrophagen zu analysieren.

Wie aus der RT-qPCR (c) hervorgeht, sind die *Pim-1* mRNA Level nach 2 Stunden GM-CSF-Behandlung signifikant um 16 % reduziert, im Vergleich zu den unbehandelten Tag 0 Monozyten. An Tag 1 steigen diese um das 1,54-fache an. Die PIM1 Proteinlevel sind hingegen nur schwach zu erkennen und nehmen an Tag 3 auch nur in geringen Maße zu, wie in Abbildung 29 (b) deutlich wird. Allerdings kommt es auf mRNA-Ebene zu einer Abnahme der *Pim-1* Spiegel, welche mit einem Wert von 1,07 annähernd dem der unbehandelten Proben an Tag 0 entspricht. Mit dem Beginn der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen an Tag 5 [102] ist eine Verdopplung des PIM1 Proteinsignals, gegenüber den Monozyten an Tag 3, zu erkennen. Die mRNA Level steigen zudem auch wieder an und sind mit einem Wert von 1,38 signifikant hochreguliert im Vergleich zur *Pim-1* mRNA an Tag 0. Dies trägt möglicherweise dazu bei, dass die Proteinlevel von PIM1 an Tag 7 deutlich um 0,6 erhöht sind. Zudem nehmen gegen Ende des Differenzierungsprozesses die *Pim-1* mRNA Spiegel wieder ab und liegen mit 1,07 bei dem gleichen Wert wie die mRNA Level der Tag 3 Monozyten. An Tag 10 verringern sich die PIM1 Proteinspiegel der Makrophagen wieder auf das Niveau der Tag 1 Monozyten und gleichzeitig steigen die mRNA Level von *Pim-1* wieder signifikant um das 2,5-fache an.

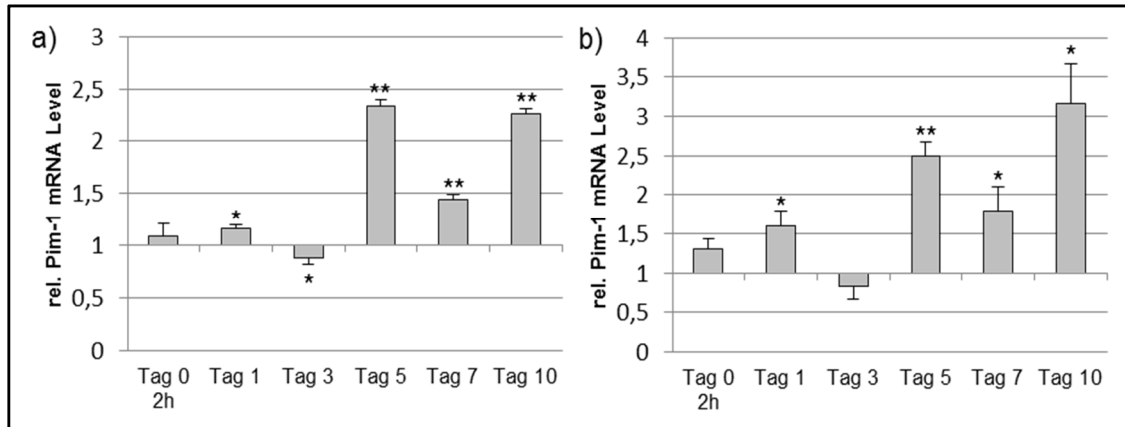


Abb.30: RT-qPCR Experimente mit Monozyten/ Makrophagen der Spender a) 3 und b) 4. Die Zellen der Spender 3 und 4 wurden jeweils an Tag 0 für einen Zeitraum von 10 Tagen mit 10 ng/ml GM-CSF behandelt. Relative *Pim-1* mRNA Level an Tag 0 2h (Spender 3: n=3, Spender 4: n=5), Tag 1 (Spender 3: n=3, Spender 4: n=5), Tag 3 (Spender 3: n=3, Spender 4: n=4), Tag 5 (Spender 3: n=3, Spender 4: n=4), Tag 7 (Spender 3 und 4: jeweils n=3) und Tag 10 (Spender 3 und 4: jeweils n=3) normiert auf β -Aktin und Tag 0 Monozyten (unbehandelt) (Spender 3: n=3, Spender 4: n=5). Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von n unabhängigen Zellproben. Die Signifikanz der Expressionslevel ist als P-Wert folgendermaßen angegeben: *p < 0,05, **p < 0,01.

Mit Hilfe der beiden RT-qPCR Experimente zwei weiterer Spender (a) und (b) aus der Abbildung 30 können die Ergebnisse der RT-qPCR aus Abbildung 29 (c) bestätigt werden. Es wird aus beiden Diagrammen ersichtlich, dass wie bereits beim Spender zuvor die *Pim-1* mRNA im Verlauf der 10 Tage, bei einer Behandlung der Zellen mit 10 ng/ml GM-CSF, periodisch schwanken.

Zunächst fällt bei Betrachtung der *Pim-1* mRNA Spiegel der Spenders 3 und 4 auf, dass die des Spenders 4 generell etwas stärker hoch- beziehungsweise runterreguliert sind als die von Spender 3. Nach 2 Stunden GM-CSF-Behandlung der Tag 0 Monozyten ist eine geringe Hochregulation von 1,09 der *Pim-1* mRNA des Spenders 3 zu erkennen. Für den Spender 4 ist diese Zunahme der mRNA, verglichen mit den unbehandelten Tag 0-Proben, mit 1,3 sogar etwas höher. Dies ist anders als für den Spender 2 (Abb.29), wo eine signifikante Abnahme der *Pim-1* mRNA zu diesem Zeitpunkt detektiert werden konnte. An Tag 1 ist ein leichter, aber dennoch signifikanter Anstieg der mRNA Level beider Spender ersichtlich. Wiederum ist, im Gegensatz zu Spender 2, eine Reduktion der *Pim-1* mRNA Spiegel der Blutspender 3 und 4 nach einer 3 tägigen GM-CSF-Behandlung jeweils um 12 % und 17 % zu sehen. Für Spender 3 ist diese Verringerung der mRNA signifikant. Für die Monozyten der beiden Spender aus Abbildung 30 an Tag 5 wird, wie bereits für Spender 2, mit Beginn des Differenzierungsprozesses eine signifikante Erhöhung der *Pim-1* mRNA Level von 2,3 für Spender 3 und 2,5 für Spender

4 deutlich. Diese sinken zwar an Tag 7 wieder signifikant für beide Spender, liegen aber etwas über denen der Tag 1 Monozyten. Für die Makrophagen der Spender 3 und 4 kann an Tag 10 der GM-CSF-Behandlung wieder eine signifikante Steigerung der *Pim-1* mRNA Spiegel detektiert werden, was mit den mRNA Leveln des Spenders 2 übereinstimmt. Für den Spender 3 konnten Werte der *Pim-1* mRNA im Bereich der Tag 5-Proben ermittelt werden. Für den Spender 4 sind allerdings mit einem 3,17-fachen Anstieg die höchsten über den gesamten Zeitraum gemessenen mRNA Level, im Vergleich zu den unbehandelten Monozyten an Tag 0, zu verzeichnen.

4. Diskussion

4.1 Sind Statine geeignete Medikamente für den Einsatz in der Krebstherapie?

Statine sind kompetitive Inhibitoren der HMG-CoA Reduktase und damit des Mevalonatweges, aus dem nicht nur Cholesterin als wichtige Komponente der Zellmembran hervorgeht, sondern auch Isoprenoide, die über Prenylierungen (Farnesylierung, Geranylgeranylierung) posttranslational Proteine modifizieren, die wiederum essentiell für die Aktivität weiterer Signalkaskaden der GTPasen (Ras, Rac, Rho) sind. Da diese Signalweiterleitung bei der Tumorentstehung und Entwicklung von großer Bedeutung ist, können Statine verschiedene Gewebefunktionen und spezifische Signalwege der Apoptose, Proliferation, Zellwanderung und Tumordinvasion beeinflussen [39]. Dadurch vermitteln Statine verschiedene anti-neoplastische oder pleiotrope Effekte deren Wirkungsgrad abhängig ist von der Art beziehungsweise Struktur der Statine, die eingesetzte Konzentration und Dauer der Statin-Behandlung, dem Vorhandensein geeigneter Membrantransporter und die zu behandelnde Krebsart [21]. Hierbei beeinflussen Statine hauptsächlich die molekularen Signalwege von PI3K/AKT, der MAP Kinase, des Transkriptionsfaktors NF- κ B und anderer Serin/Threonin Proteinkinasen [21], wie zum Beispiel PIM1, sodass mehrere Zielmoleküle im Tumor adressiert werden können [39].

Interessanterweise beziehen Krebszellen Lipide für ihre Membransynthese hauptsächlich aus den gebildeten Stoffwechselprodukten des Mevalonatweges [160], weshalb die Veränderung des Lipidstoffwechsels unter anderem ein Merkmal von Tumoren darstellt [161, 162]. Diese Veränderung zeichnet sich durch eine Fehlregulation beziehungsweise verstärkte Regulation des Mevalonatweges aus, denn entartete Zellen benötigen eine höhere Verfügbarkeit dieser Metabolite als die entsprechenden gesunden Zellen [163]. Aus diesem Grund sind viele intrazelluläre Signalwege der Tumorzelle auf den Mevalonatweg abgestimmt, sodass das Überleben der Krebszellen und die Tumorprogression innerhalb des generell fehlregulierten Stoffwechsels aufrechterhalten werden kann [39]. So ruft zum Beispiel eine Interaktion des Tumorsuppressors p53 mit SREBP (*sterol response element binding protein*) eine erhöhte Expression der Gene des Mevalonatweges hervor [163]. Dies könnte zum Beispiel erklären, dass der Statin-Effekt in schlecht differenzierten, malignen Neubildungen stärker ist als in gutartigen Tumoren und in gut differenzierten, bösartigen Krebszellen, denn Letztere wachsen nicht so schnell beziehungsweise weisen einen

ähnlichen Stoffwechsel wie gesunde Zellen auf, weshalb der Bedarf an Isoprenoiden kaum erhöht ist [31, 164]. Allgemein reagieren gesunde Zellen weniger sensitiv auf die anti-proliferativen Eigenschaften von Statinen, da sie im Vergleich zu malignen Krebserkrankungen langsamer wachsen und somit ebenfalls einen geringeren Verbrauch an Cholesterin und anderen Isoprenoiden haben [165]. Des Weiteren sind Statine in der Lage durch Inhibition der Cholesterin-Biosynthese eine Konformationsänderung des Glukosetransporters herbeizuführen, da es sich hierbei um ein Protein mit mehreren Transmembrandomänen handelt und dieses dann nicht länger über Cholesterin mit der Membran assoziiert werden kann. Dadurch wird der Stoffwechsel der Tumorzellen, welche einen erhöhten Verbrauch von Glukose aufweisen, eingeschränkt [166]. Ein weiterer Vorteil von Statinen als mögliches Krebsmedikament ist die Verfügbarkeit dieses Arzneistoffes in oral verabreichbarer Form und die Kenntnisse von Nebenwirkungen aus Langzeitstudien der Hypercholesterinämie-Therapie, sodass Statine einfacher für klinische Studien zur Krebsbehandlung zugelassen werden können [39]. So haben hydrophile Statine wie Pravastatin kaum Nebenwirkungen auf Nicht-Leberzellen oder zeigen kaum unerwünschte Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten, auf Grund der spezifischen Aufnahme und Akkumulation dieser Statine in der Leber sowie der unwesentlichen Metabolisierung durch das CYP-System (Cytochrom-P450-System) [30, 167]. Weiterhin ist bekannt, dass Statine in geringen bis moderaten Konzentrationen weniger toxisch sind als Zytostatika [21] und Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika [39] und Bestrahlung sensibilisieren [168]. Der Grad der Zytotoxizität von Statinen scheint zudem abhängig von der zu behandelnden Tumorart [23].

Verschiedene *in vivo* Studien in Mäusen konnten die *in vitro* Untersuchungen zu Brust-, Magen-, Nieren- und Prostatakrebs hinsichtlich der erfolgreichen Inhibition des Tumorwachstums und der Metastasenbildung unter Statin-Gabe bestätigen [21, 29]. Auch klinische Phase I und II Studien, Populationsstudien sowie Metaanalysen diverser Studien verschiedener Krebsarten konnten zeigen, dass die Einnahme von Statinen vor und nach der Krebsdiagnose die Überlebenschancen von Patienten steigert [169]. So konnte bei Patienten mit Prostata-Karzinomen beobachtet werden, dass das Risiko der Tumorprogression, einschließlich der Metastasenbildung, sinkt und die Überlebensquote von Patienten mit einer kombinierten Strahlentherapie erhöht ist [169, 170]. Bei Brustkrebsstudien konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Hier wurde eine verringerte Wahrscheinlichkeit des Wiederauftretens des Tumors und Voranschreitens der Tumorerkrankung bei Einnahme lipophiler Statine beobachtet [171-173]. Allerdings konnte weder für Prostata- noch für Brustkrebs durch eine Statin-Behandlung ein präventiver Erfolg erzielt werden [21, 22]. Hingegen haben Fall-Kontroll-Studien und

Kohorten-Studien von Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom nachgewiesen, dass die Statin-Einnahme allgemein mit einem reduzierten Risiko von Leberkarzinomen assoziiert ist [174, 175]. Widersprüchlich hierzu sind allerdings die Ergebnisse zu Untersuchungen kolorektaler Karzinome. Metaanalysen von 42 Studien konnten nur eine moderate Abnahme des Krebsrisikos aufzeigen, welches sich auch bei einer Langzeit-Einnahme von Statinen nicht weiter verringerte [176].

Trotz diverser vielversprechender Ergebnisse, die aus klinischen Studien der Monotherapie mit Statinen hervorgegangen sind, liegt hierfür die benötigte Statin-Dosis zur Hemmung des Wachstums und Induktion der Apoptose oft sehr hoch (orale Lovastatin-Dosis ≥ 25 mg/kg Körpergewicht [177]) und ist daher mit starken Nebenwirkungen verbunden. Deshalb wurden Studien zu Kombinationstherapien von Statinen mit Bestrahlung oder anderen Medikamenten, meist Zytostatika, durchgeführt um durch einen zu erwartenden synergistischen Effekt eine höhere Effizienz der Anti-Tumor-Effekte zu erzielen und die Einsatzmenge beider Arzneimittel verringern zu können. Dies konnte bereits für einige Tumormodelle durch *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen in der Maus mit Cisplatin [178], 5-Fluorouracil [179] und Doxorubicin [180] gezeigt werden. Jedoch ist die Auswahl möglicher Kombinationstherapeutika dadurch begrenzt, dass vor allem lipophile Statine aber auch zahlreiche, konventionelle Zytostatika über das CYP-System in den Leberzellen metabolisiert, also entweder in ihre aktive Form umgewandelt oder abgebaut werden. Dadurch kann es zum eingeschränkten Stoffwechsel kommen, was mit einer verringerten Wirkung von sogenannten Prodrugs oder mit einer Anreicherung der Medikamente einher geht und damit zu vermehrten Nebenwirkungen führen kann [21, 29]. Aus diesem Grund ergaben Studien zu Kombinationstherapien mit Simvastatin und den zytostatischen Prodrugs Cisplatin, Gemcitabin oder Capecitabin, einer Vorstufe von 5-Fluorouracil, bei Patienten mit Magenkrebs oder Bauchspeicheldrüsenkrebs keine positiven Ergebnisse hinsichtlich verstärkter Anti-Tumor-Effekte [181, 182]. Zudem hat die Analyse einer Intensiv-Dosis-Einzeltherapie mit Atorvastatin oder Simvastatin ergeben, dass hohe Statin-Konzentration zu einem verstärkten Risiko von Abweichungen der Leberfunktion führen [183]. Dies kann erhöhte Leberenzym-Werte oder eine Hepatotoxizität zur Folge haben [21, 22]. Eine Metaanalyse mit niedrigen und mittleren Statin-Dosen hat hingegen kein signifikant erhöhtes Risiko bezüglich der Entwicklung von Lebererkrankungen aufdecken können [184]. Darüber hinaus können Statine zur Ausbildung weiterer ernsthafter Nebenwirkungen wie Muskelerkrankungen und Diabetes führen, was in Metaanalysen von 90 verschiedenen Studien aufgezeigt werden konnte [21, 29, 185]. Andere Studien haben sogar postuliert, dass durch die Einnahme von Statinen ein erhöhtes Risiko zur Krebsentstehung besteht [186, 187], was jedoch wieder in Frage gestellt wurde, da in

diesen Untersuchungen die Prädisposition zur Krebserkrankung nicht berücksichtigt wurde [188].

Im Allgemein lässt sich sagen, dass Statine bezüglich des Einsatzes bei schwerwiegenden Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, unter anderem hervorgerufen durch Hypercholesterinämie, sowie bei der Behandlung einiger Tumorarten erheblich zur Minderung der Beschwerden beitragen. Eine Heilung von Krebserkrankungen konnte allerdings bisher nicht erzielt werden. Die bislang erzielten divergenten Ergebnisse aus verschiedenen Studien ermöglichen derzeit keine Zulassung von Statinen als Medikamente zur Behandlung von Krebs. In einigen Fällen konnte das Voranschreiten des Tumors gestoppt und damit die Sterblichkeitsrate von Krebspatienten reduziert werden. Auch *in vitro* Experimente haben bei einer typischen Statin-Dosierung von 2-40 μM Anti-Tumor-Effekte aufzeigen können. Andere Studien der Monotherapie oder der Kombinationstherapie konnten allerdings keine entsprechenden Effekte belegen oder waren teilweise mit starken Nebenwirkungen verbunden. Dennoch erscheint generell das Risiko schädlicher Nebenwirkungen bezüglich der Leber und Muskulatur relativ klein zu sein im Vergleich zu den Vorteilen, die durch Statine erhalten werden. Somit bleibt die wichtige Frage zur optimalen Krebstherapie mit Statinen noch ungeklärt. Aus diesem Grund besteht auch weiterhin ein großes Forschungsinteresse hinsichtlich der Aufklärung der molekularen Mechanismen, die durch Statine in Tumorzellen moduliert werden, damit die beobachteten Effekte mechanistisch besser verstanden werden können. Welches Statin, in welcher Dosis, für welche Krebsart am besten geeignet ist, ist weiterhin eine relevante Fragestellung. Ein Ansatz hierfür ist die Bestimmung der Expressionsrate diverser Biomarker, wie die der HMG-CoA Reduktase, des IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) Rezeptors sowie der MAP Kinase, um somit eine verträgliche Konzentration von Statinen für eine Einzel- oder Kombinationstherapie zu verabreichen. Allerdings sollte bei der Kombinationstherapie darauf geachtet werden keine zusätzlichen Medikamente, die über das CYP-System verstoffwechselt werden, einzusetzen um mögliche Interaktionen der Medikamente zu vermeiden. Beispiele für geeignete Kombinationstherapeutika könnten siRNAs, miRNAs [20], monoklonale Antikörper [17] oder Inhibitoren der Protein-Prenylierung, wie der Farnesyltransferase-Inhibitor, sein. Abschließend kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Statine, basierend auf ihren Anti-Tumor-Effekten und den nur gering zytotoxischen Eigenschaften, vielversprechende Wirkstoffe gegen Krebs darstellen könnten, wenn vorab geklärt werden konnte ob der Patient für eine solche Monotherapie geeignet ist. Zudem können Statine in geringer oder moderater Dosis auch sehr gut zur Unterstützung der Krebstherapie in Kombination mit

anderen Substanzen und Arzneistoffen mit Zielmolekül-gerichteter Wirkung, Anwendung finden [21, 22, 39].

4.2 Wird der Statin-vermittelte PIM1 Knockdown über die transkriptionelle Ebene reguliert?

Ähnlich wie bei anderen Proteinkinasen wird die Expression von PIM1 im Wesentlichen über die Transkription gesteuert. Diese wird hauptsächlich über die Transkriptionsfaktoren STAT3 oder STAT5 (*signal transducers and activators of transcription*) reguliert, welche an das ISFR/GAS-Sequenzmotiv (*gamma interferon activation sequence*) des *Pim-1* Promotors binden und somit eine Zunahme der Transkriptionsaktivität, vermittelt über die Phosphorylierung durch die Januskinase (JAK) oder den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor kappa-B*), bewirken [57, 61-63]. Dass Statine ebenfalls in der Lage sind eine Veränderung der Genexpression hervorzurufen, konnten Gbelcova und Kollegen 2017 in der Bauchspeicheldrüsen-Krebszelllinie MiaPaCa-2 beobachten [189]. Dabei ist die Art des Statins von Bedeutung, wobei lipophile Statine, wie Simvastatin, die höchste Effizienz bei der Modifikation des Genexpressions-Profiles aufweisen. Zudem ging aus diesen Untersuchungen hervor, dass die eingesetzte Statin-Konzentration ebenso einen Einfluss auf die Genexpression besitzt und die meisten durch Statine gesteuerten Gene in der Regulation des Mevalonatweges, des Zellzykluses, der DNA-Replikation, der Apoptose und des Zytoskeletts involviert sind. Darüber hinaus vermuten Forscher hierbei auch eine Abhängigkeit vom analysierten Zelltyp [31, 189]. Ähnliche Resultate ergaben die Analysen von Bjarnadottir *et al.* in verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien (MCF7, BT474, SKBR3, MDAMB231) [190], die eine Veränderung der Transkriptionsaktivität von Genen durch Statine aufzeigen konnten, welche an der Immunantwort, Apoptose, sowie dem PI3K/AKT- und MAPK-Signalweg beteiligt sind. Weiterhin konnten Ivanov und Hei 2011 beobachten, dass Statine NF- κ B- und STAT3-regulierte Gene in verschiedenen Melanom-Krebszelllinien inhibieren [155]. Da die PIM1 Kinase sowohl den Zellzyklus als auch die Apoptose in Krebszellen beeinflussen kann, zudem ein Target der PI3K/AKT-Signalkaskade [57] darstellt sowie durch NF- κ B und STAT3 reguliert wird, ergeben sich erste Hinweise auf eine mögliche Inhibition der *Pim-1* Transkription durch Statine.

Dies deutet sich auch zunächst für die *Pim-1* mRNA Level nach 48 und 54 Stunden Simvastatin-Behandlung für die Zelllinien HepG2 und LS174T aus den RT-qPCR Experimenten der Abbildungen 13 (a) und (b), 19 (c) und 21 (c) sowie 25 (c) und 26 (c)

an. Hierbei konnte eine signifikante Abnahme der *Pim-1* mRNA Level im Bereich von 50 bis 72 % nachgewiesen werden. Zudem lässt sich vermuten, dass eine Statin-Inkubation für 36 Stunden (Abb.13 a) reduzierte *Pim-1* mRNA Spiegel in Relation zur DMSO-Kontrolle in den HepG2 Zellen bewirkt. Da sich nach einer 24 stündigen Simvastatin-Behandlung kein stabiler Effekt, gekennzeichnet durch eine hohe Standardabweichung, auf die *Pim-1* mRNA Level abzeichnet, sollten hierfür noch weitere Experimentenreihen durchgeführt werden. Interessanterweise kann in der Zelllinie Skov3, anders als in den HepG2 und LS174T Zellen, nach 48 Stunden Statin-Gabe eine signifikante Hochregulation der endogenen *Pim-1* mRNA Level nachgewiesen werden (Abb.13 b). Dies bestätigt die Beobachtungen von Gbelcova *et al.* [189], dass die Statin-Wirkung auf das Expressions-Profil einzelner Gene, abhängig vom Zelltyp oder der Zelllinie, variiert. Da die Resultate einen Statin-vermittelten Knockdown der *Pim-1* Genexpression in HepG2 und LS174T Zellen nach 48 Stunden vermuten lassen, wurde eine weitergehende Analyse der STAT3-bedingten Regulation der *Pim-1* Expression, mit Hilfe eines Dual-Luciferase-Assays, vorgenommen, da dieser Transkriptionsfaktor einen Hauptregulator zur Induktion der *Pim-1* Transkription darstellt [57, 61-63]. Wie aus den Ergebnissen der Abbildung 15 (b), (c) und (d) hervorgeht, ist in den mit Simvastatin behandelten HepG2 Proben keine deutliche Herunterregulation der Transkriptionseffizienz der mit dem *Pim-1* Promotorbereich vorgelagerten Firefly-Luciferase der pFR_HCV_xb+*Pim-1*-STAT3 BS Wildtyp- oder Mutanten (mut/mut2)-Plasmide, verglichen mit den DMSO-Kontrollproben, zu erkennen. Da zudem auch die mit dem pFR_HCV_xb+*Pim-1*-STAT3 BS mut/mut2-Plasmid transfizierten HepG2 Zellen nach einer DMSO Inkubation keine Reduktion der Transkriptionseffizienz zeigen, obwohl eine Bindung von STAT3 auf Grund der mutierten Bindestelle nicht möglich ist, ist anzunehmen, dass die Statin-bedingte Herunterregulation von *Pim-1* nicht durch eine Abnahme der Phosphorylierung beziehungsweise Inaktivierung von STAT3 vermittelt ist. Somit kann vermutlich ebenfalls eine PIM1 bedingte Aktivierung von STAT3 durch eine negative Feedbackregulation über die Phosphorylierung der Transkriptionsregulatoren SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) [53, 61-63, 191], unter Statin-Gabe ausgeschlossen werden. Denn auch hier wäre eine verringerte Transkriptionsaktivität der Firefly-Luciferase zu erwarten gewesen, da die *Pim-1* Expression durch Simvastatin inhibiert ist. Hingegen wird ein massiver Statin-Effekt auf das pFR_HCV_xb-Leerplasmid in Abbildung 15 (c) und (d) deutlich, da diese Proben eine starke Verminderung der Firefly-Luciferase-Expression nach einer 48 stündigen Simvastatin-Inkubation zeigen. Jedoch ergab eine Vorhersage der Transkriptionsfaktor-Bindestelle des circa 1 kb großen *Pim-1* Promotorbereiches in Abbildung 14, mit Hilfe des Webservers ALGGEN, neben einer zweiten STAT3-Bindestelle an Position -78 noch Bindestellen weiterer

Transkriptionsfaktoren, die durch Statine reguliert sein könnten. Dadurch würde sich zwar die fehlende Herunterregulation der Firefly-Expression der mit pFR_HCV_xb+Pim-1-STAT3 BS mut/mut2-Plasmid transfizierten HepG2 Zellen sowohl unter Statin-Gabe als auch nach DMSO-Behandlung erklären (Abb.15 b, c, d), aber ob es sich hierbei um eine tatsächliche STAT3-Bindestelle handelt und ob diese, sowie die der anderen Transkriptionsfaktoren, funktionell sind, ist nicht bekannt. Zudem ist der für die allgemeine Vorhersage der Transkriptionsfaktor-Bindestellen verwendete Webserver weniger spezifisch als das Programm, das für die gezielte Suche nach einer STAT3-Bindestelle eingesetzte Programm *Homer*, welches lediglich die mutierte STAT3-Bindestelle an Position -926 mit einem sehr hohen *score* ermitteln konnte und exakt mit der Sequenz von Vallania *et al.* übereinstimmt [120]. Des Weiteren kommt ein Einfluss der anderen, durch Statine herunterregulierten Transkriptionsfaktoren (NF- κ B [21, 39, 40, 155, 192], p53 [21, 40], AP-1 [21, 190, 192], Myc [39, 40], SREBP-1 [34, 39]) für den Statin-vermittelten *Pim-1* Knockdown möglicherweise ebenfalls nicht in Betracht, da auch hier eine starke Abnahme des Firefly-Luciferase-Signals der mit pFR_HCV_xb+Pim-1-STAT3 BS Wildtyp- oder Mutanten (mut/mut2)-Plasmid transfizierten Zellen unter Simvastatin-Gabe zu erwarten gewesen wäre. Diese Vermutung kann durch das Transfektions-Experiment in den Skov3 Zellen aus der Abbildung 12 weiter bestärkt werden. Denn in allen mit Simvastatin behandelten Proben konnte ein verringertes PIM1 Proteinsignal detektiert werden, obwohl die ektopische Expression von PIM1 unter dem Einfluss eines CMV-Promotors erfolgte.

Demnach scheint die Regulation der *Pim-1* Transkription sehr wahrscheinlich nicht durch Simvastatin inhibierbar zu sein, was jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, da die ektopische Expression von PIM1 in den Skov3 Zellen ein artifizielles System darstellt und die analysierte Sequenz des *Pim-1* Promotorbereiches nur ungefähr 1 kb umfasst. Dennoch kann eine generelle Statin-vermittelte Regulation der Genexpression in Krebszellen, wie in der Literatur beschrieben, angenommen werden.

4.3 Wird der Statin-vermittelte PIM1 Knockdown über die posttranskriptionelle Ebene reguliert?

Der mRNA Abbau stellt ein Mittel für die Kontrolle der Genexpression zur Einstellung basaler Transkriptspiegel und zur Regulation von mRNAs, wie zum Beispiel die von Proto-Onkogenen, dar. Der Abbau kann über mehrere Wege ablaufen. Entweder vom 3'-Ende her, durch Entfernung des Poly(A)-Schwanzes (Deadenylierung), wovon hauptsächlich mRNAs mit A/U-reichen Sequenzabschnitten in der 3'-UTR betroffen sind, oder vom 5'-Ende her, durch Abspaltung der 7-Methylguanosin-Kappe (*decapping*).

Dieser Abbauweg wird durch Transkripte mit stark strukturierten 5'-UTRs beschleunigt [193]. Eine weitere Möglichkeit ist die Degradation durch Endonukleasen, vermittelt durch miRNAs oder endogenen siRNAs, welche an spezifische Sequenzen innerhalb der mRNA binden [194, 195]. Die mRNA von *Pim-1* weist diese genannten Merkmale der 3'- [59, 62, 63] und 5'-UTR [64, 72] auf und stellt ein Target unter anderem für miR-33a dar [71, 196], weshalb diese mRNA von einer kurzen Halbwertszeit geprägt ist. Darüber hinaus haben bereits einige Untersuchungen zur posttranskriptionellen Regulation durch Statine ergeben, dass diese die mRNA Stabilität, abhängig vom Ziel-Transkript und dem eingesetzten Statin, beeinflussen können. Einerseits können Statine wie Rosuvastatin und Simvastatin in Endothelzellen zur Stabilität der mRNA von eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*), durch Erhöhung der Polyadenylierung, beitragen [197]. Andererseits kann Atorvastatin den mRNA Abbau des ABCB1-Transporters in HepG2 Zellen induzieren [198].

Der erste Hinweis, dass Simvastatin den PIM1 Knockdown über die posttranskriptionelle Ebene regulieren könnten, ergibt sich aus den verringerten *Pim-1* mRNA Leveln der in Abbildungen 13, 19 (c) und 21 (c) sowie 25 (c) und 26 (c) dargestellten RT-qPCRs. Obwohl mit Hilfe dieser Methode nicht geklärt werden kann ob die Reduktion der *Pim-1* mRNA eine Folge der Inhibition von Transkriptionsfaktoren und damit der Genexpression oder des mRNA Abbaus ist, konnten die Ergebnisse des Dual-Luciferase-Assays (Abb.15) und der ektopischen Expression von PIM1 (Abb.12) doch weitestgehend darlegen, dass Statine den PIM1 Knockdown wahrscheinlich nicht über die transkriptionelle Ebene regulieren. Deshalb wurden HepG2 Zellen über einen Zeitraum von 8 bis 12 Stunden mit α -Amanitin behandelt um die DNA-abhängigen RNA-Polymerase II-vermittelte Transkription von mRNAs zu blockieren und daraus Informationen bezüglich eines möglichen *Pim-1* mRNA Abbaus gewinnen zu können. Diese Proben aus Abbildung 17 weisen eine 64 bis 74 %ige signifikante Abnahme der *Pim-1* mRNA Level auf, was auf eine Inhibition der Translokation der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II an der DNA zurückzuführen ist. Eine weitere signifikante Reduktion der *Pim-1* mRNA Spiegel auf 90 bis 94 % nach einer 24 stündigen Simvastatin-Präinkubation und einer 8 bis 12 stündigen α -Amanitin-Behandlung lässt vermuten, dass Statine tatsächlich eine Degradation der *Pim-1* mRNA hervorrufen können. Dieses Ergebnis steht jedoch im Widerspruch zu der Erkenntnis von Kosmidou und Kollegen, dass Simvastatin zur mRNA Stabilität von eNOS beiträgt [197]. Da es sich allerdings hierbei um ein anderes Ziel-Transkript handelt, ist eine *Pim-1* mRNA Degradation vermittelt durch Simvastatin nicht auszuschließen. Zur Validierung dieses Versuchs zum

mRNA Abbau in HepG2 Zellen könnte ein weiterer Ansatz mit Actinomycin D, einem gebräuchlichen Inhibitor der Transkriptions-Elongation, verwendet werden [132]. Auch weitere Analysen ergaben jedoch keinen genaueren Aufschluss worüber Simvastatin den Abbau der *Pim-1* mRNA vermitteln könnte. Denn wie aus dem Western Blot der Abbildung 16 zum Nachweis der TTP-Level hervorgeht, sind diese nach einer 48 stündigen Simvastatin-Behandlung in HepG2 Zellen um 52 bis 61 % und in LS174T Zellen um 32 bis 38 % herunterreguliert. Da es sich bei Tristetraprolin (TTP) um ein RNA-Bindeprotein handelt, welches an A/U-reiche Sequenzen in der 3'-UTR von *Pim-1* bindet und somit dessen mRNA destabilisieren kann [66, 67], wäre hierbei eher ein Anstieg des TTP-Signals im Vergleich zu den DMSO-Kontrollproben zu erwarten gewesen. Des Weiteren konnte der Western Blot aus Abbildung 12 zur ektopischen Expression von PIM1 in Skov3 Zellen zeigen, dass Simvastatin den PIM1 Knockdown nicht über miR-33a oder regulatorische Sequenzen in der 3'-UTR von *Pim-1* vermittelt. Denn in den Zellen, die mit den PIM1 cDNA Konstrukten transfiziert wurden, welche eine zu 2/3 deletierte 3'-UTR (pCMV6-XL4 PIM1 Δ 3'-UTR) oder eine mutierte miR-33a Bindestelle (pCMV6-XL4 PIM1 3'mut33a) aufweisen, konnten nach 48 Stunden Inkubation mit Simvastatin jeweils verringerte PIM1-Level verglichen mit den DMSO-Proben detektiert werden, was auf einen weiterhin bestehenden Statin-Effekt hindeutet. Jedoch ist die Bindung anderer microRNAs in dem circa 1/3 großen, noch verbliebenen Bereich der 3'-UTR des pCMV6-XL4 PIM1 Δ 3'-UTR Konstruktes nicht auszuschließen, wodurch sich möglicherweise die verringerten PIM1 Proteinsignale nach einer 48 stündigen Simvastatin-Inkubation erklären lassen würden. Dennoch unterstützt dieses Experiment das Ergebnis aus den Untersuchungen der Tristetraprolin-Level nach Simvastatin-Gabe in den HepG2 und LS174T Zellen (Abb.16), da auch das Konsensus-Bindemotiv von TTP in dem pCMV6-XL4 PIM1 Δ 3'-UTR Konstrukt nicht mehr vorhanden ist (siehe Anhang: *Pim-1* cDNA Wildtyp Sequenz (NM_002648.2)). Des Weiteren können mit Hilfe dieser Untersuchung die Versuche von Dr. Kerstin Lange-Grünweller zur Analyse des Knockouts von *Pim-1* nach einer Simvastatin- und miR-33a AntimiR-Doppelbehandlung in HepG2 Zellen bestätigt werden. Diese ergaben, dass durch eine Herunterregulation von miR-33a, vermittelt durch ein miR-33a-AntimiR, der Statin-Effekt auf *Pim-1* nicht aufgehoben werden kann.

Somit kann angenommen werden, dass der Statin-vermittelte Knockdown von PIM1 in den HepG2 Zellen nicht aus einer inhibierten Transkription der *Pim-1* mRNA resultiert, sondern in großem Ausmaß durch den mRNA Abbau hervorgerufen wird, auch wenn genauere Analysen zum mRNA Abbau von *Pim-1*, durch TTP oder miR-33a, keine weiteren Aufschlüsse geben konnten.

4.4 Wird der Statin-vermittelte PIM1 Knockdown über die translationelle Ebene reguliert?

Die translationelle Regulation stellt einen wichtigen Mechanismus zur Kontrolle von Proteinen dar, die in zelluläre Prozesse wie Differenzierung und Wachstum involviert sind [75]. Darüber hinaus ist die Regulation der Translation bereits vorhandener mRNAs schneller als die Regulation über die Transkriptionsebene [199]. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist hierbei die Translations-Initiation, weshalb diese am stärksten einer Steuerung unterliegt. Eine Schlüsselfunktion nehmen dabei die Translations-Initiationsfaktoren ein, da sie die Regulationsmaschinerie der Translation darstellen und somit auch einen großen Einfluss auf die Krebsentstehung und das Voranschreiten von Tumoren haben [199, 200]. Die Translations-Initiationsfaktoren und deren Untereinheiten, wie beispielsweise eIF2 α , eIF2 β , eIF2B, eIF4B, eIF4F (bestehend aus eIF4A, eIF4E, eIF4G), können wiederum durch wichtige Signalwege wie die PI3K/AKT-, mTOR-, MAP-Kinase- und Ras-Signalkaskade mittels Phosphorylierung reguliert werden [200-202]. Dadurch kann die Expression von Proteinen, deren Translations-Initiation *cap*-abhängig ist, über diesen Mechanismus gesteuert werden. So ist unter anderem eine Regulation der Translationseffizienz der *Pim-1* mRNA durch das *cap*-Bindeprotein eIF4E möglich [72], dessen erhöhte Level bereits in einigen Tumorarten der Brust, Leber und des Dickdarms nachgewiesen werden konnten [203]. Aber auch eine stark strukturierte 5'-UTR der mRNA, hervorgerufen durch einen hohen G/C-Gehalt, kann die Translationseffizienz verringern, indem eine ineffiziente Entwindung von stabilen RNA-Sekundärstrukturen durch RNA-Helikasen eine effiziente Bindung des 43S Prä-Initiationskomplexes erschwert. Deshalb stellt die konservierte, von Sekundärstrukturen geprägte 5'-UTR von *Pim-1* ein wichtiges Regulationselement dar und verdeutlicht somit die biologische Relevanz dieser *prosurvival*-Kinase [64, 72, 200, 203].

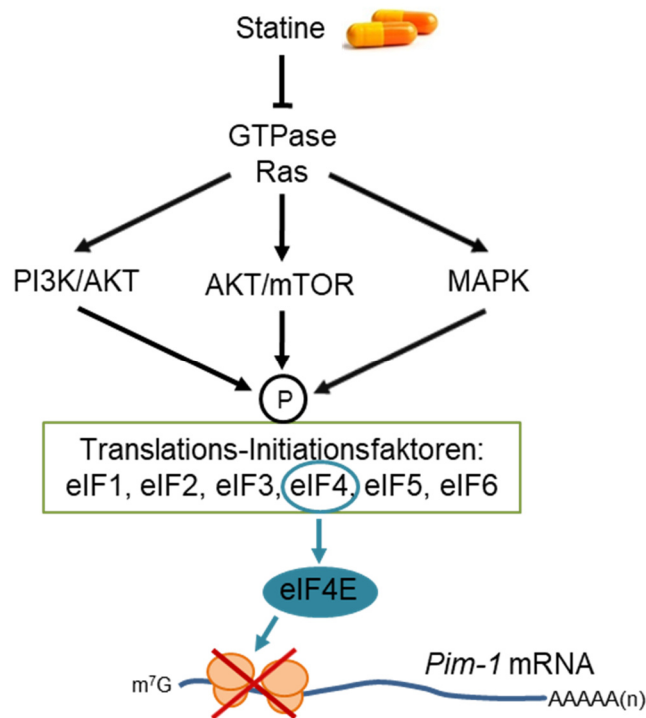


Abb. 31: Schematische Darstellung möglicher, durch Statine vermittelte Regulationsmechanismen auf die Translation der *Pim-1* mRNA. Die fehlende Ausbildung des Ras-Membranankers und die dadurch bedingte Inhibition dieser GTPase bewirkt eine Veränderung in der Aktivität der verschiedenen Kinasen (PI3K, AKT, mTOR, MAPK). Diese können wiederum durch Phosphorylierung der Translations-Initiationsfaktoren und deren Untereinheiten die Translations-Initiation hemmen.

Zudem wurde bereits gezeigt, dass Statine ebenfalls Einfluss auf die Translation mittels Regulation der Translations-Initiationsfaktoren und deren regulatorische Signalwege nehmen können [191, 204-207]. Vor allem die Inhibition der GTPase Ras durch Statine lässt einen Zusammenhang zwischen Simvastatin und die Unterdrückung der Translation der *Pim-1* mRNA durch eine reprimierende Regulation der Translations-Initiationsfaktoren vermuten. So konnten Tuckow und Kollegen zeigen [191], dass Simvastatin die Translation, durch eine verringerte Aktivität des Translations-Initiationsfaktors eIF2B, welcher einen GTP „Exchange-Faktor“ darstellt, in der Myoblastomzelllinie der Maus (*C₂C₁₂*) unterdrückt. Sie vermuteten eine verringerte Aktivität von eIF2Bε durch verstärkte Phosphorylierung des inhibitorisch-wirkenden Serinrestes 535 dieser Untereinheit oder durch eine reduzierte Phosphorylierung von AKT an dessen Serin 473, was zu einer Abnahme der Aktivität von mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) und somit zur Inhibition der Proteinsynthese von eIF2Bε führt. Als weitere Möglichkeit zogen sie die ausbleibende Isoprenylierung und damit die fehlende Verankerung von Interaktionspartnern einzelner Untereinheiten von eIF2B in Betracht. Ähnliche Resultate wurden für die Zelllinie HepG2.2.15

beobachtet. Simvastatin ist hierbei verantwortlich für die zunehmende Phosphorylierung von eIF2 α am Serinrest 51, wodurch die Aktivität von eIF2 β eingeschränkt und die Translations-Initiation gehemmt wird [207]. Des Weiteren konnten 2008 Woodard et al., [205] in den Krebszelllinien der Niere (786-0, CAKI-2) belegen, dass Fluvastatin mit Hilfe des AKT/mTOR-Signalweges die Translations-Initiation blockiert. Sie konnten zeigen, dass eine Phosphorylierung beziehungsweise Aktivierung von AKT mit der Inhibition von mTOR und der p70 S6 Kinase einhergeht. Letztere resultiert in einer erhöhten Expression des Tumorsuppressors PDCD4 (*programmed cell death 4*), was einen hemmenden Einfluss auf die RNA-Helikase eIF4A zur Folge hat [200, 202]. Die Inhibition von mTOR führt zudem zur gesteigerten Aktivität von eIF4E, wodurch es zur Ausbildung des eIF4E-Bindeprotein-eIF4E-Komplexes kommt, welcher eine *cap*-abhängige Translation verhindert.

Dass Simvastatin auch die Translation der *Pim-1* mRNA in der Dickdarmkrebs-Zelllinie LS174T hemmen könnte, wird in den Western Blots zur Inhibition der Translations-Elongation deutlich. Wie vermutet, kann bei einem Vergleich der PIM1 Proteinsignale aus den Abbildungen 21 und 22 durch Zunahme der Cycloheximid-Konzentration von 45 μ M auf 60 μ M eine verstärkte Abnahme dieser Proteinlevel und damit eine Hemmung der Translation beobachtet werden. Die Doppelbehandlungsproben mit 25 μ M Simvastatin und 45 μ M Cycloheximid (Abb.21) beziehungsweise 60 μ M Cycloheximid (Abb.22) zeigen jeweils eine Reduktion der PIM1 Proteinlevel um 70 % beziehungsweise 63 % und sind damit stärker herunterreguliert als die jeweiligen Simvastatin- oder Cycloheximid-Einzelbehandlungsproben. Dies lässt auf einen synergistischen Knock-down-Effekt auf PIM1 schließen, welcher der Erwartung einer Simvastatin-bedingten Herunterregulation von PIM1 auf translationeller Ebene entspricht. Wie aus der RT-qPCR (Abb.21 c) zur Kontrolle der *Pim-1* mRNA Spiegel in den LS174T Zellen hervorgeht, basieren die verringerten PIM1 Proteinsignale in der Cycloheximid-Einzelbehandlung sowie der Doppelbehandlung nicht auf erniedrigten *Pim-1* mRNA Level, sondern sind das Resultat der durch Cycloheximid inhibierten Translation. Eventuell könnte durch die Inhibition der Translations-Elongation auch der mRNA Abbau, vermutlich durch Senkung der *decapping* Rate der mRNA, erniedrigt sein, was bereits in Hefe gezeigt werden konnte [194, 208]. Darüber hinaus kann aus der Abbildung 21 (c) entnommen werden, dass der Statin-Effekt in der Doppelbehandlung der LS174T Zellen fast vollständig aufgehoben ist, da die *Pim-1* mRNA Level dieser Proben mit einem signifikanten Anstieg um das 6,4-fache ähnlich hochreguliert sind wie die der Cycloheximid-Einzelbehandlung mit einer 6,7-fachen, ebenfalls signifikanten,

Zunahme im Vergleich zu den DMSO-Kontrollproben. Unterstützende Erkenntnisse hierzu können die Ergebnisse des *metabolic labeling* aus Abbildung 23 (b) liefern. Denn hierbei kann nach 48 Stunden Simvastatin-Inkubation eine 66 %ige signifikante Abnahme an S^{35} gelabeltem Gesamtprotein im Vergleich zu den DMSO-behandelten LS174T Zellen detektiert werden, was auf eine Verringerung der Translationsrate durch Simvastatin hindeutet. Durch Zugabe von Mevalonat steigt in den Doppelbehandlungsproben die Translationsrate wieder signifikant auf ungefähr 70% an, woraus geschlossen werden kann, dass es sich hierbei tatsächlich um einen Translationseffekt, vermittelt durch Simvastatin, handelt.

Etwas anders stellt es sich hingegen in der Leberkrebs-Zelllinie HepG2 dar. Hier können keine allgemeinen inhibierenden Effekte auf die Translation (Abb. 23 a) beobachtet werden, da nach 48 Stunden Simvastatin-Behandlung ein stärkerer Einbau von S^{35} gelabelten Methionin/Cystein in neusynthetisierte Proteine nachweisbar ist als in den Kontrollproben. Allerdings zeigen die Experimente zur Inhibition der Translations-Elongation in den Abbildungen 19 und 20, dass durch Simvastatin die PIM1 Proteinlevel und damit die Translation der *Pim-1* mRNA sinkt. Denn in den Doppelbehandlungsproben mit 10 μ M Simvastatin und entweder 45 μ M oder 60 μ M Cycloheximid kann eine stärkere Abnahme der PIM1 Spiegel, im Bereich von 74 bis 90 %, als in den jeweiligen Einzelbehandlungen beobachtet werden. Dies verweist auf einen synergistischen Knockdown-Effekt, welcher somit in der Leberkarzinom-Zelllinie stärker ausgeprägt zu sein scheint als in den LS174T Zellen. Dadurch kann vermutet werden, dass der Statin-vermittelte Knockdown von PIM1 in den HepG2 Zellen ebenfalls auf translationeller Ebene reguliert ist. Die *Pim-1* mRNA Spiegel (Abb.19 c) der Cycloheximid-Einzelbehandlung weisen allerdings einen 3,4-fachen Anstieg im Vergleich zu den Doppelbehandlungsproben mit 10 μ M Simvastatin und 45 μ M Cycloheximid mit einer Zunahme um das 2,4-fache auf, was auf einen weiterhin bestehenden Statin-Effekt auf mRNA Ebene beziehungsweise den Abbau der *Pim-1* mRNA hindeuten könnte. Dadurch würden sich auch die stärker reduzierten PIM1 Proteinlevel in den mit Simvastatin und Cycloheximid behandelten Proben (Abb.19, 20) im Vergleich zu denen der LS174T Zellen (Abb.21, 22) erklären lassen, welche möglicherweise das Resultat aus einer verringerten Menge an *Pim-1* mRNA und einer inhibierten Translation darstellen. Denn es besteht in der Zelle eine Konkurrenz um die 5' Kappe der mRNA und damit zwischen Translation und mRNA Abbau bedingt durch die Entfernung dieser am 5'-Ende gelegenen 7-Methylguanosin-Kappe [209]. So konnte in Hefezellen gezeigt werden, dass die Mutation von Translations-Initiationsfaktoren [209] oder eine Hemmung dieser Faktoren, zum Beispiel durch Statine, sowie eine stark strukturierte 5'-UTR [210] die Blockierung der Translation bewirken und gleichzeitig die Degradation der mRNA

fördern kann. Des Weiteren existieren Proteine, die die mRNA stabilisieren können, wie PAPB1 (Poly(A)-binding protein), welches vornehmlich eIF4G bindet und somit einen geschlossenen 3'-5' Schleifen-Komplex durch Interaktion mit dem an der 5'-Kappe gebundenen Translations-Initiationsfaktor eIF4E bildet, sodass die mRNA vor dem Abbau geschützt ist [211]. Im Gegensatz dazu befinden sich auch mRNA-Destabilisierungsproteine wie *decapping factors* (DCP1, DCP2) und das eIF4E-Bindeprotein 4E-T in der Zelle, die den Abbau der 5'-Kappe zur Folge haben [194, 212]. Diese mRNA Abbau-regulierenden Proteine könnten neben den Translations-Initiationsfaktoren oder dessen regulatorische Signalwege ein möglicher Angriffspunkt für Statine zur Inhibition von PIM1 in HepG2 und LS174T Zellen darstellen. Zur Überprüfung einer möglichen Simvastatin-vermittelten Inhibition der Translations-Initiation der *Pim-1* mRNA in HepG2 Zellen sollten ursprünglich Untersuchungen der *Pim-1* 5'-UTR herangezogen werden (Anhang Abb.32). Jedoch zeigte das für den Dual-Luciferase-Assays eingesetzte Leerplasmid bereits eine starke Reaktion auf die Gabe von Simvastatin, sodass dieser Versuch nicht ausgewertet werden konnte.

Somit scheint der Statin-bedingte Knockdown von PIM1 in den HepG2 und LS174T Zellen auf translationeller Ebene reguliert zu sein. Zudem kann angenommen werden, dass auf dieser Ebene der Statin-Effekt in den HepG2 Zellen spezifisch für PIM1 ist, wohingegen vermutlich in der Dickdarm-Krebszelllinie auf eine unspezifische Statin-Wirkung geschlossen werden kann. Darüber hinaus konnten die Kontrollexperimente zur Translations-Elongation hinsichtlich der *Pim-1* mRNA Spiegel die Analysen zum mRNA Abbau in den HepG2 Zellen bestätigen.

4.5 Wird der Statin-vermittelte PIM1 Knockdown über die posttranslationelle Ebene reguliert?

Bei PIM1 handelt es sich um eine Kinase mit geringer Halbwertszeit, da diese einem hohen *protein turnover* unterliegt [46, 76]. Dieser Abbau kann durch vorherige Übertragung von Ubiquitin [46] oder SUMO-Proteinen [76] auf PIM1 erfolgen. Zudem können Hitzeschock-proteine wie HSP90 oder HSP70 die Proteinstabilität beeinflussen, indem sie PIM1 entweder vor dessen Degradation im 26S-Proteasom schützen oder eine verstärkte Ubiquitylierung herbeiführen [46, 78]. Allerdings konnten Shay und Kollegen beobachten, dass trotz einer Inhibition des Proteasoms durch Bortezomib PIM1 noch weiter abgebaut werden kann und schlossen daraus, dass für diese Kinase noch ein zusätzlicher, durch HSP70 vermittelter Abbauweg über die Lysosomen existieren könnte [46]. Zur Wirkung von Statinen hinsichtlich des Proteinabbaus konnten Proteom-Analysen zeigen, dass Signalwege, die die Ubiquitylierung von Proteinen regulieren,

durch Lovastatin gehemmt werden [206]. Zudem konnte in einer Brustkrebszelllinie nachgewiesen werden, dass Lovastatin den Zellzyklus, durch proteasomalen Abbau von p21 und p27, stoppt. Jedoch ist dies eventuell auf einen spezifischen Effekt der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren zurückzuführen und nicht auf den generellen Einfluss von Statinen auf den Proteinabbau [213, 214]. Auch Wojcik und seine Kollegen konnten nur eine Modulation der 20S-Untereinheit des Proteasoms, aber keine vollständige Inhibition, durch Lovastatin oder Simvastatin in einer Kolonkarzinom-Zelllinie beobachten [215].

Da die SUMOylierung ein wichtiger Regulationsmechanismus der zellulären Stressantwort sowie der Tumorgenese darstellt [216] und der Abbau von PIM1 durch SUMO-Proteine vermittelt werden kann [76], wurden die Level der SUMO-Proteine 1-4 nach 48 stündiger Simvastatin-Inkubation in HepG2 Zellen analysiert. So ist aus dem Western Blot der Abbildung 24 zu erkennen, dass lediglich die SUMO-Proteine 2-4 einen leichten Anstieg unter Statin-Einfluss zeigen, wohingegen für das SUMO-Protein 1 eine geringe Abnahme zu verzeichnen ist. Demnach kann Simvastatin vermutlich kein oder nur ein minimaler Einfluss auf die globale Sumoylierung von Proteinen zugesprochen werden.

Des Weiteren können die Ergebnisse von Shay et al., [46] zum Nachweis des Proteinabbaus von PIM1 nach Bortezomib-Behandlung in der Zelllinie K562 mit Hilfe der Western Blots in den HepG2 (Abb.25) und LS174T Zellen (Abb.26) bestätigt werden, welche in beiden Zelllinien eine stärkere Anreicherung der PIM1 Proteinlevel aufweisen als die DMSO-Kontrollproben. Dies lässt den Schluss zu, dass die Aktivität des Proteasoms durch Bortezomib erfolgreich inhibiert werden konnte und es dadurch zu einer Anreicherung von PIM1 in der Zelle kommt. Allerdings ist in den Doppelbehandlungsproben mit Simvastatin und Bortezomib keine Aufhebung der Statin-vermittelten Herunterregulation von PIM1 durch Hemmung der Proteasom-Aktivität zu erkennen. Denn die PIM1 Level entsprechen nicht denen der Bortezomib-Einzelbehandlung mit einem ungefähren 2,5-fachen Anstieg, sondern liegen ungefähr im Bereich der DMSO-Proben, wie im Fall der LS174T Zellen (Abb.26), oder zeigen, im Fall der HepG2 Zellen, nur eine circa 2-fache Zunahme im Vergleich zur DMSO-Behandlung (Abb.25). Somit können die Ergebnisse von Wojcik et al. [215], und Li et al. [207], durch die Resultate aus den Western Blots zur Inhibition des Proteasoms bestätigt werden, welche ebenfalls sowohl Simvastatin als auch aus gleichen Geweben stammende Zelllinien für ihre Versuche verwendet haben. Zudem wird erneut aus den RT-qPCR-Experimenten in beiden Zelllinien deutlich, dass Simvastatin die PIM1 Kinase

auf mRNA Ebene reguliert. Denn hierbei sind die *Pim-1* Transkript-Level der Doppelbehandlungsproben in den HepG2 Zellen (Abb.25 c) schwach herunterreguliert verglichen mit den DMSO-Kontrollproben oder, wie in den LS174T Zellen, sogar noch stärker verringert als die mit Simvastatin-behandelten Proben (Abb.26 c). Da jedoch die Standardabweichungen in einigen Proben der beiden Zelllinien sehr hoch sind, müssten Wiederholungen dieses Versuches durchgeführt werden um eine sichere Aussage treffen zu können. Demnach sollten gleichbleibende *Pim-1* mRNA Level beobachtet werden können, unabhängig von der Behandlung der Zellen, wenn der Statin-vermittelte Knockdown von PIM1 ausschließlich über einen verstärkten Proteinabbau reguliert wäre. Zudem scheint es unwahrscheinlich, dass die mRNA Spiegel einen Einfluss auf die Aktivität des Proteasoms ausüben.

Darüber hinaus wurde die Simvastatin-Wirkung auf den Abbau von PIM1 im Lysosom in HepG2 Zellen untersucht (Abb.27). Hierbei kann zunächst ein Statin-bedingter Abbau von PIM1 über die Lysosomen vermutet werden, da unter Simvastatin-Gabe nicht nur die PIM1 Level, sondern auch die MAP LC3 α/β Level im Vergleich zu den DMSO-behandelten Proben sinken, was auf einen Abbau dieser Lysosom-Membranproteine hindeutet. Jedoch zeigen die Doppelbehandlungsproben mit Simvastatin und den jeweiligen lysosomalen Inhibitoren, dass die PIM1 Proteinsignale geringer sind als die entsprechenden allein mit Lysosom-Inhibitor-behandelten Proben. Somit scheint Simvastatin den PIM1 Knockdown nicht über den lysosomalen Abbau zu regulieren, ähnlich wie zuvor bei den Untersuchungen zur Inhibition des Proteasoms, da der Statin-Effekt auf PIM1 durch die lysosomalen Inhibitoren nicht aufgehoben werden konnte. Zudem ergibt sich ein leichter Widerspruch bezüglich der MAP LC3 α/β Spiegel in den Doppelbehandlungsproben, welche nicht wie erwartet unverändert zu denen der Einzelbehandlung mit lysosomalen Inhibitoren sind, sondern hierzu eine leichte Zunahme verzeichnen. Da jedoch die quantitative Auswertung mit ImageJ manuell erfolgte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die MAP LC3 α/β Level der Proben beider Behandlungen gleichermaßen reguliert sind. Interessanterweise liegen die PIM1 Proteinsignale nach Behandlung der HepG2 Zellen mit jeweils einer Kombination aus lysosomalen Inhibitoren ungefähr im Bereich der DMSO-Kontrollproben beziehungsweise leicht darunter, woraus geschlossen werden kann, dass PIM1 nicht über den lysosomalen Weg abgebaut wird. Denn hierfür wäre ein Anstieg der PIM1 Level verglichen mit der DMSO-Behandlung, wie schon zuvor in den Experimenten mit Bortezomib gezeigt, zu erwarten gewesen. Allerdings ist diese Erkenntnis nicht unerwartet, denn Lysosomen dienen dem Abbau langlebiger Proteine und zerstörter Organellen [81] sowie falsch gefalteter Proteine [80].

Somit lässt sich abschließend sagen, dass der Statin-vermittelte Knockdown von PIM1 vermutlich nicht über dessen Abbau durch das Proteasom und Lysosomen reguliert zu sein scheint.

4.6 Fazit zum Statin-vermittelten Knockdown der PIM1 Kinase in Krebszellen

Mit Hilfe der analysierten Western Blots konnte eine eindeutige Reduktion der PIM1 Proteinsignale nach einer 48 stündigen Simvastatin-Inkubation in HepG2 und LS174T Zellen nachgewiesen werden. Diese haben zudem stets leicht verringerte β -Aktin Level Simvastatin-behandelter Proben in allen in dieser Arbeit verwendeten Krebszelllinien aufzeigen können, was auf eine Hemmung der Proliferation hinweisen könnte, welche bereits in der Literatur beschrieben ist [21-23, 39, 40]

Bei einem Vergleich des Simvastatin-Einflusses auf die *Pim-1* mRNA Level nach 48 Stunden in Abbildung 13 ist der Knockdown-Effekt in HepG2 mit 65 % und in LS174T mit 72 % ähnlich stark in beiden Zelllinien. Für die PIM1 Proteinlevel aus Abbildung 18 ist hingegen nach 48 Stunden mit einer Abnahme von 62 bis 95 % in den HepG2 Zellen ein deutlich stärkerer Effekt zu erkennen als in den LS174T Zellen mit 46 bis 69 %. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass das Leberkarzinom histologisch dem Zielwirkort von Statinen entspricht. Wie bereits erwähnt, beeinflussen zudem die verschiedenen Arten von Geweben [21] und der Grad der Malignität des Tumors die Stärke des Statin-Effektes [164]. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass, in der Dickdarmkrebs-Zelllinie LS174T höhere Simvastatin-Konzentrationen benötigt werden um inhibitorische Effekte auf PIM1 zu erzielen. Darüber hinaus können Statine auf vielfältige Art und Weise in Krebszellen wirken. Dies ergibt sich daraus, dass Statine auf Grund der Hemmung des Mevalonatweges und der damit verbundenen Isoprenoid-Synthese die Prenylierung von Membranproteinen (GTPasen) verhindern [22, 23]. Dadurch ist die Signalweiterleitung der betroffenen Signalwege aller Regulationsebenen der Zelle gestört oder aufgehoben. Demnach ist die PIM1 Kinase kein direktes Target von Statinen. Stattdessen scheint der Statin-bedingte PIM1 Knockdown viel mehr das Resultat veränderter Regulationsmechanismen zu sein, was den relativ späten Wirkungsbeginn von Simvastatin nach 36 bis 48 Stunden erklären könnte. Bei Betrachtung aller Untersuchungen zur Statin-vermittelten Herunterregulation von PIM1 ist eine Wirkung über die posttranslationelle Ebene durch den Abbau dieser *prosurvival* Kinase mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen, denn hierbei konnte kein Einfluss von Simvastatin auf das Proteasom (Abb.25, 26) oder das Lysosom (Abb.27) beobachtet werden. Des Weiteren kann vermutlich auch die transkriptionelle Ebene ausgeschlossen werden, da trotz der Abnahme der *Pim-1* mRNA Spiegel nach Simvastatin-Gabe in den

HepG2 und LS174T Zellen sowohl das Ergebnis aus dem Dual-Luciferase-Assay (Abb.15) keinen Einfluss von Simvastatin gezeigt hat als auch der Versuch zur ektopischen Expression von PIM1 unter einem Nicht-*Pim-1*-Promotor weiterhin reduzierte PIM1 Level nach Simvastatin-Behandlung detektiert werden konnten (Abb.12). Folglich müssen die verringerten *Pim-1* mRNA Level in den HepG2 aus der Degradation dieser resultieren. Mit Hilfe des RT-qPCR Experimentes zur Inhibition der Transkriptions-Initiation, vermittelt durch α -Amanitin, kann in den HepG2 Zellen diese Vermutung untermauert werden (Abb.17). Ein weiterer Hinweis hierzu lieferte die Analyse der mRNA Spiegel der mit Simvastatin und Cycloheximid behandelten Proben aus dem Kontrollexperiment zur Inhibition der Translations-Elongation (Abb.19 c), da die *Pim-1* mRNA Level in der Doppelbehandlung nicht so stark hochreguliert sind wie in der Cycloheximid-Einzelbehandlung. Ob ein Statin-vermittelter Knockdown auf posttranskriptioneller Ebene auch in den LS174T Zellen zutreffen könnte, muss noch in einem entsprechenden Experiment abgeklärt werden. Hier konnten allerdings die Untersuchungen zur Inhibition der Translations-Elongation (Abb.21, 22), vermittelt durch Cycloheximid, den Simvastatin-bedingten Knockdown von PIM1 auf translationeller Ebene bestätigen. Allerdings deutet der Versuch des *metabolic labeling* (Abb.23 b) in den LS174T Zellen eher auf eine unspezifische Statin-Wirkung bezüglich der Translation-Inhibition hin. Auch in den HepG2 Zellen scheint Simvastatin eine Herunterregulation von PIM1 über diese Ebene zu bewirken. Da das *metabolic labeling* (Abb.23 a) keinen inhibierenden Einfluss auf die Translation von Proteinen Simvastatin-behandelter HepG2 Zellen zeigen konnte und in den Untersuchungen zur Translations-Elongation (Abb.19, 20) ein PIM1 Knockdown beobachtet werden konnte, kann ein spezifischer Einfluss von Simvastatin auf translationeller Ebene vermutet werden. Damit existiert die Möglichkeit, dass Simvastatin in beiden Zelllinien die PIM1 Kinase auf posttranskriptioneller und translationeller Ebene reguliert. In den HepG2 Zellen scheint der Statin-Effekt verstärkt auf dem mRNA Abbau von *Pim-1* zu liegen und sich in geringem Ausmaß auf die Inhibition der Translation auszuwirken. In der Dickdarmkrebs-Zelllinie LS174T hingegen ist vermutlich die Simvastatin-Wirkung vorwiegend auf translationeller Ebene durch Hemmung von Translations-Initiationsfaktoren oder deren Regulationsmechanismen [191, 205-207]. Ein mRNA Abbau von *Pim-1* kann nicht ausgeschlossen werden, da auch hier verringerte mRNA Level nach einer Simvastatin-Behandlung detektiert wurden (Abb.17). Zudem konnte bereits in Hefezellen gezeigt werden, dass die Blockierung der Translation gleichzeitig die Degradation der mRNA [209, 210], zum Beispiel vermittelt durch mRNA-Destabilisierungsproteine wie *decapping factors* und das eIF4E-Bindeprotein 4E-T, bewirkt [194, 212]. Dadurch kann bestätigt werden, dass Statine durch Unterdrückung des Mevalonatweges und somit

einer verhinderten Verankerung von GTPasen in der Zellmembran durch fehlende Prenylierung mehrere Regulationsebenen beeinflussen können [22, 23].

4.7 Mögliche Funktion von PIM1 in Monozyten und Makrophagen

PIM1 ist eine *prosurvival* Kinase, die unter anderem das Zellwachstum beziehungsweise die Zellteilung fördert, die Apoptose in Tumorzellen unterdrückt und deren Differenzierung reguliert [54, 57, 62]. Da ein Knockout der PIM1 Kinase in Mäusen lediglich zu einem geringfügig veränderten Phänotyp führt [88], stellt sich die Frage nach der Funktion dieser für das Überleben so wichtigen Kinase in gesunden Zellen. Dabei fokussierten sich die Untersuchungen in dieser Arbeit auf die Rolle von PIM1 als Regulator für die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen. Deshalb kamen hierbei primäre M1 Makrophagen zum Einsatz, da diese für die Anti-Tumor-Immunantwort verantwortlich sind [104]. Dafür wurden zunächst Monozyten aus menschlichem Spenderblut isoliert und bis zur Makrophagen-Reife kultiviert. Die Umsetzung erfolgte durch den Einsatz von Lipopolysacchariden (LPS) und Interferonen oder Wachstumsfaktoren, welche die Transkription von *early response genes*, wie *Pim-1*, induzieren können [62, 108, 109]. Die eingesetzten Cytokine GM-CSF [114] und INF γ [112] bewirken eine Aktivitätssteigerung des JAK/STAT-Signalweges, welcher eine wichtige regulatorische Signalkaskade bei Differenzierungsprozessen darstellt [114]. Weil dieser Signalweg auch eine Hochregulation der *Pim-1* Expression hervorruft [114], konnten erste Informationen über die mögliche Rolle von PIM1 bei der Zelldifferenzierung in Nicht-Tumorzellen gewonnen werden.

Für den Spender 1 in Abbildung 28 kann beobachtet werden, dass unter GM-CSF-Gabe die PIM1 Protein- und mRNA Level der Monozyten an Tag 3 und der Makrophagen an Tag 12 höher sind als nach LPS- und INF γ -Behandlung. Des Weiteren lässt sich feststellen, dass die *Pim-1* mRNA Level nach einer 18 stündigen LPS- und INF γ -Inkubation über den gesamten Zeitraum von 5 bis 12 Tagen im Vergleich zu den unbehandelten Tag 0-Monozyten signifikant herunterreguliert sind. Dadurch kann vermutet werden, dass das Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon γ nicht zur Induktion des *Pim-1* Transkriptes führen oder eine Behandlungsdauer von 18 Stunden hierfür nicht ausreichend ist. Allerdings ist sowohl für Spender 1 nach LPS- und INF γ -Gabe (Abb.28 a, b) als auch für Spender 2 nach GM-CSF-Inkubation (Abb.29 a, b) an den Tagen 5 und 7 zu beobachten, dass die PIM1 Proteinlevel hier ein Maximum aufweisen. Da in diesem Zeitraum *in situ* die Monozyten aus dem Blut in die Gewebe einwandern und dort zu

Makrophagen ausdifferenzieren [102], könnte zunächst vermutet werden, dass PIM1 eine mögliche Funktion bei der Differenzierung von gesunden Zellen einnimmt. Des Weiteren ist bei der Betrachtung der *Pim-1* mRNA Spiegel nach je einer 10 ng/ml GM-CSF-Behandlung der Spender 2 (Abb.29 c), 3 (Abb.30 a) und 4 (Abb.30 b) zu erkennen, dass diese über den gesamten Zeitraum von 10 Tagen oszillieren, also teilweise starken Schwankungen unterliegen. Besonders interessant ist dabei, dass mit Beginn der Differenzierung der Monozyten zu M1 Makrophagen an Tag 5 die mRNA Level von *Pim-1* in allen drei Spendern signifikant im Vergleich zu Tag 3 ansteigen, gefolgt von einer deutlichen Abnahme an Tag 7 und dem Abschluss des Differenzierungsprozesses. Vor allem für die Spender 3 und 4 aus Abbildung 30 (a) und (b) ist zu sehen, dass die Expression der *Pim-1* mRNA während der Differenzierung und im Stadium der ausgereiften M1 Makrophagen zunimmt. Damit deutet sich auch auf transkriptioneller Ebene an, dass *Pim-1* möglicherweise einen wichtigen Einfluss auf die Differenzierung hat und sich in ausdifferenzierten M1 Makrophagen anreichert. Jedoch wäre für eine evidenzbasierte Aussage zur Funktion von PIM1 bei der Differenzierung primärer Zellen ein Knockout-Experiment mit Hilfe eines PIM1 Inhibitors oder einer spezifischen siRNA nötig, um zu analysieren ob der Differenzierungsprozess verlangsamt oder gar blockiert ist durch die Hemmung der PIM1 Kinase beziehungsweise dessen mRNA. Denn allein schon die Behandlung der Monozyten mit den hier verwendeten Cytokinen, GM-CSF und Interferon γ , führt zu einer Induktion des bei der Differenzierung involvierten JAK/STAT-Signalweges [114], weshalb kein eindeutiger Rückschluss auf die Rolle von PIM1 beim Differenzierungsprozess gesunder, Nicht-Tumorzellen möglich ist. Zudem existieren neben den STAT-Transkriptionsfaktoren [217] noch weitere Transkriptionsfaktoren, die an den *Pim-1* Promotor binden können (siehe Abb.14) und dadurch eventuell eine Differenzierung der Makrophagen aus Monozyten herbeiführen. So bewirken NF- κ B [112] und AP-1 [107, 115] die Differenzierung der Monozyten zu M1 Makrophagen. Zwar kommt es während der Differenzierung zur gesteigerten Expression von *Pim-1* durch die JAK/STAT5- Signalkaskade [114], aber die durch Spender 1 gewonnenen Kenntnisse aus der LPS- und INF γ -Behandlung der Monozyten an Tag 4 beziehungsweise Tag 5 deuten an, dass PIM1 nur einer von vielen Faktoren der Differenzierung darstellt und andere, ebenfalls durch den JAK/STAT-Weg induzierten Regulatoren, hierbei involviert zu sein scheinen. Denn die bei Spender 1 detektierten *Pim-1* mRNA Level an Tag 5 sind im Vergleich zu den unbehandelten Tag 0 Monozyten stark herunterreguliert. Dennoch erfolgte die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen.

Trotzdem lassen die hier zugrunde liegenden Daten und die Kenntnisse aus dem Tumorkontext eine mögliche Funktion von PIM1 als einen wichtigen Regulator bei der Differenzierung von Monozyten vermuten.

Quellenverzeichnis

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
2. Fouad, Y.A. and C. Aanei, *Revisiting the hallmarks of cancer*. Am J Cancer Res, 2017. **7**(5): p. 1016-1036.
3. www.cancer.gov
4. Spring, B., et al., *Fostering multiple healthy lifestyle behaviors for primary prevention of cancer*. Am Psychol, 2015. **70**(2): p. 75-90.
5. Anand, P., et al., *Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes*. Pharm Res, 2008. **25**(9): p. 2097-116.
6. Schwender, H., et al., *Distinct SNP combinations confer susceptibility to urinary bladder cancer in smokers and non-smokers*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51880.
7. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 789-99.
8. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
9. Barrett, J.C., *Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment*. Environ Health Perspect, 1993. **100**: p. 9-20.
10. Weinstein, I.B., *Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer*. Science, 2002. **297**(5578): p. 63-4.
11. Renan, M.J., *How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data*. Mol Carcinog, 1993. **7**(3): p. 139-46.
12. Merlo, L.M., et al., *Cancer as an evolutionary and ecological process*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(12): p. 924-35.
13. Croce, C.M., *Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(10): p. 704-14.
14. Croce, C.M., *Oncogenes and cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(5): p. 502-11.
15. Mitra, A.K., et al., *Novel delivery approaches for cancer therapeutics*. J Control Release, 2015. **219**: p. 248-268.
16. Hamilton, G. and B. Rath, *A short update on cancer chemoresistance*. Wien Med Wochenschr, 2014. **164**(21-22): p. 456-60.
17. Jackson, S.E. and J.D. Chester, *Personalised cancer medicine*. Int J Cancer, 2015. **137**(2): p. 262-6.
18. Imai, K. and A. Takaoka, *Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(9): p. 714-27.
19. Ernst, B. and K.S. Anderson, *Immunotherapy for the treatment of breast cancer*. Curr Oncol Rep, 2015. **17**(2): p. 5.
20. Kasinski, A.L. and F.J. Slack, *Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(12): p. 849-64.

21. Matuszewicz, L., et al., *The effect of statins on cancer cells--review*. *Tumour Biol*, 2015. **36**(7): p. 4889-904.
22. Kubatka, P., et al., *Statins in oncological research: from experimental studies to clinical practice*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014. **92**(3): p. 296-311.
23. Osmak, M., *Statins and cancer: current and future prospects*. *Cancer Lett*, 2012. **324**(1): p. 1-12.
24. Istvan, E.S. and J. Deisenhofer, *Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase*. *Science*, 2001. **292**(5519): p. 1160-4.
25. Alberts, A.W., et al., *Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(7): p. 3957-61.
26. Endo, A., *Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a Monascus species*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1979. **32**(8): p. 852-4.
27. Endo, A., M. Kuroda, and Y. Tsujita, *ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by Penicillium citrinium*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1976. **29**(12): p. 1346-8.
28. Corsini, A., F.M. Maggi, and A.L. Catapano, *Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase*. *Pharmacol Res*, 1995. **31**(1): p. 9-27.
29. Chan, K.K., A.M. Oza, and L.L. Siu, *The statins as anticancer agents*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(1): p. 10-9.
30. Schachter, M., *Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2005. **19**(1): p. 117-25.
31. Menter, D.G., et al., *Differential effects of pravastatin and simvastatin on the growth of tumor cells from different organ sites*. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e28813.
32. Elshourbagy, N.A., H.V. Meyers, and S.S. Abdel-Meguid, *Cholesterol: the good, the bad, and the ugly - therapeutic targets for the treatment of dyslipidemia*. *Med Princ Pract*, 2014. **23**(2): p. 99-111.
33. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor*. *Cell*, 1997. **89**(3): p. 331-40.
34. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(20): p. 11041-8.
35. Moore, K.J., et al., *The role of microRNAs in cholesterol efflux and hepatic lipid metabolism*. *Annu Rev Nutr*, 2011. **31**: p. 49-63.
36. Ness, G.C., Z. Zhao, and D. Lopez, *Inhibitors of cholesterol biosynthesis increase hepatic low-density lipoprotein receptor protein degradation*. *Arch Biochem Biophys*, 1996. **325**(2): p. 242-8.
37. Bourne, H.R., D.A. Sanders, and F. McCormick, *The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions*. *Nature*, 1990. **348**(6297): p. 125-32.
38. Denoyelle, C., et al., *Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study*. *Carcinogenesis*, 2001. **22**(8): p. 1139-1148.

39. Iannelli, F., et al., *Targeting Mevalonate Pathway in Cancer Treatment: Repurposing of Statins*. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery, 2018. **13**(2): p. 184-200.
40. Pisanti, S., et al., *Novel prospects of statins as therapeutic agents in cancer*. Pharmacol Res, 2014. **88**: p. 84-98.
41. Kato, S., et al., *Lipophilic but not hydrophilic statins selectively induce cell death in gynaecological cancers expressing high levels of HMGCoA reductase*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(5): p. 1180-93.
42. Warfel, N.A. and A.S. Kraft, *PIM kinase (and Akt) biology and signaling in tumors*. Pharmacol Ther, 2015. **151**: p. 41-9.
43. Yla-Herttuala, S., et al., *Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(10): p. 1015-26.
44. Selten, G., H.T. Cuypers, and A. Berns, *Proviral activation of the putative oncogene Pim-1 in MuLV induced T-cell lymphomas*. EMBO J, 1985. **4**(7): p. 1793-8.
45. Cuypers, H.T., et al., *Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region*. Cell, 1984. **37**(1): p. 141-50.
46. Shay, K.P., et al., *Pim-1 kinase stability is regulated by heat shock proteins and the ubiquitin-proteasome pathway*. Mol Cancer Res, 2005. **3**(3): p. 170-81.
47. Mikkers, H., et al., *Mice deficient for all PIM kinases display reduced body size and impaired responses to hematopoietic growth factors*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(13): p. 6104-15.
48. Qian, K.C., et al., *Structural basis of constitutive activity and a unique nucleotide binding mode of human Pim-1 kinase*. J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 6130-7.
49. Aweya, J.J., et al., *Identification and molecular characterization of the Pim1 serine/threonine kinase homolog in Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol, 2018. **74**: p. 491-500.
50. Eichmann, A., et al., *Developmental expression of pim kinases suggests functions also outside of the hematopoietic system*. Oncogene, 2000. **19**(9): p. 1215-24.
51. Muraski, J.A., et al., *Pim-1 regulates cardiomyocyte survival downstream of Akt*. Nat Med, 2007. **13**(12): p. 1467-75.
52. Zippo, A., et al., *Identification of Flk-1 target genes in vasculogenesis: Pim-1 is required for endothelial and mural cell differentiation in vitro*. Blood, 2004. **103**(12): p. 4536-4544.
53. Bachmann, M. and T. Möröy, *The serine/threonine kinase Pim-1*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(4): p. 726-30.
54. Wang, Z., et al., *Pim-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis*. J Vet Sci, 2001. **2**(3): p. 167-79.
55. Saris, C.J., J. Domen, and A. Berns, *The pim-1 oncogene encodes two related protein-serine/threonine kinases by alternative initiation at AUG and CUG*. EMBO J, 1991. **10**(3): p. 655-64.
56. Xie, Y., et al., *The 44 kDa Pim-1 kinase directly interacts with tyrosine kinase Etk/BMX and protects human prostate cancer cells from apoptosis induced by chemotherapeutic drugs*. Oncogene, 2006. **25**(1): p. 70-78.

57. Merkel, A.L., E. Meggers, and M. Ocker, *PIM1 kinase as a target for cancer therapy*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012. **21**(4): p. 425-36.
58. Palaty, C.K., et al., *Identification of the autophosphorylation sites of the *Xenopus laevis* pim-1 proto-oncogene-encoded protein kinase*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(16): p. 10514-10521.
59. Nawijn, M.C., A. Alendar, and A. Berns, *For better or for worse: the role of Pim oncogenes in tumorigenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(1): p. 23-34.
60. Reeves, R., et al., *Primary Structure of the Putative Human Oncogene, Pim-1 Gene*, 1990. **90**(2): p. 303-307.
61. Liang, C. and Y.Y. Li, *Use of regulators and inhibitors of Pim-1, a serine/threonine kinase, for tumour therapy (Review)*. *Molecular Medicine Reports*, 2014. **9**(6): p. 2051-2060.
62. Blanco-Aparicio, C. and A. Carnero, *Pim kinases in cancer: diagnostic, prognostic and treatment opportunities*. *Biochem Pharmacol*, 2013. **85**(5): p. 629-43.
63. Narlik-Grassow, M., C. Blanco-Aparicio, and A. Carnero, *The PIM family of serine/threonine kinases in cancer*. *Med Res Rev*, 2014. **34**(1): p. 136-59.
64. Wang, Z.P., et al., *cDNA cloning, sequencing and characterization of bovine pim-1*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2001. **78**(2): p. 177-195.
65. Chen, C.Y., et al., *AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs*. *Cell*, 2001. **107**(4): p. 451-64.
66. Sanduja, S., et al., *The role of tristetraprolin in cancer and inflammation*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012. **17**: p. 174-88.
67. Kim, H.K., et al., *Expression of proviral integration site for Moloney murine leukemia virus 1 (Pim-1) is post-transcriptionally regulated by tristetraprolin in cancer cells*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(34): p. 28770-8.
68. Stoecklin, G., *Posttranscriptional gene regulation: mRNA degradation in the cytoplasm*. *BioSpektrum*, 2009. **15**(5): p. 505-508.
69. Blanco, F.F., et al., *The mRNA-binding protein HuR promotes hypoxia-induced chemoresistance through post-transcriptional regulation of the serine-threonine kinase PIM1*. *Clinical Cancer Research*, 2015. **21**.
70. Nasser, M.W., et al., *Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(48): p. 33394-405.
71. Thomas, M., et al., *The proto-oncogene Pim-1 is a target of miR-33a*. *Oncogene*, 2012. **31**(7): p. 918-28.
72. Hoover, D.S., et al., *Pim-1 protein expression is regulated by its 5'-untranslated region and translation initiation factor eIF-4E*. *Cell Growth Differ*, 1997. **8**(12): p. 1371-80.
73. Wang, Z.P., M. Weaver, and N.S. Magnuson, *Cryptic promoter activity in the DNA sequence corresponding to the pim-1 5'-UTR*. *Nucleic Acids Research*, 2005. **33**(7): p. 2248-2258.
74. Kozak, M., *An Analysis of 5'-Noncoding Sequences from 699 Vertebrate Messenger-Rnas*. *Nucleic Acids Research*, 1987. **15**(20): p. 8125-8148.

75. Kozak, M., *Structural Features in Eukaryotic Messenger-Rnas That Modulate the Initiation of Translation*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(30): p. 19867-19870.
76. Iyer, R.S., et al., *A functional SUMO-motif in the active site of PIM1 promotes its degradation via RNF4, and stimulates protein kinase activity*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 3598.
77. Kim, O., et al., *Synergism of cytoplasmic kinases in IL6-induced ligand-independent activation of androgen receptor in prostate cancer cells*. Oncogene, 2004. **23**(10): p. 1838-1844.
78. Mizuno, K., et al., *Regulation of Pim-1 by Hsp90*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **281**(3): p. 663-9.
79. Ma, J., et al., *Negative regulation of Pim-1 protein kinase levels by the B56beta subunit of PP2A*. Oncogene, 2007. **26**(35): p. 5145-53.
80. Jackson, M.P. and E.W. Hewitt, *Cellular proteostasis: degradation of misfolded proteins by lysosomes*. Proteostasis, 2016. **60**(2): p. 173-180.
81. Qiao, L.Y. and J.H. Zhang, *Inhibition of lysosomal functions reduces proteasomal activity*. Neuroscience Letters, 2009. **456**(1): p. 15-19.
82. Shin, Y.G., et al., *The co-chaperone carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) mediates alpha-synuclein degradation decisions between proteasomal and lysosomal pathways*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(25): p. 23727-23734.
83. Leung, C.O.N., et al., *PIM1 regulates glycolysis and promotes tumor progression in hepatocellular carcinoma*. Oncotarget, 2015. **6**(13): p. 10880-10892.
84. Peng, Y.H., et al., *Expression of pim-1 in Tumors, Tumor Stroma and Tumor-Adjacent Mucosa Co-Determines the Prognosis of Colon Cancer Patients*. Plos One, 2013. **8**(10).
85. Tursynbay, Y., et al., *Pim-1 kinase as cancer drug target: An update*. Biomedical Reports, 2016. **4**(2): p. 140-146.
86. Magnuson, N.S., et al., *Why target PIM1 for cancer diagnosis and treatment?* Future Oncol, 2010. **6**(9): p. 1461-78.
87. Zhang, Y., et al., *Pim kinase-dependent inhibition of c-Myc degradation*. Oncogene, 2008. **27**(35): p. 4809-4819.
88. Laird, P.W., et al., *In vivo analysis of Pim-1 deficiency*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(20): p. 4750-5.
89. Vanderlugt, N.M.T., et al., *Proviral Tagging in E-Mu-Myc Transgenic Mice Lacking the Pim-1 Protooncogene Leads to Compensatory Activation of Pim-2*. Embo Journal, 1995. **14**(11): p. 2536-2544.
90. Aho, T.L., et al., *Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site*. FEBS Lett, 2004. **571**(1-3): p. 43-9.
91. Gu, J.J., et al., *PIM1 phosphorylates and negatively regulates ASK1-mediated apoptosis*. Oncogene, 2009. **28**(48): p. 4261-4271.
92. Zhang, F., et al., *PIM1 protein kinase regulates PRAS40 phosphorylation and mTOR activity in FDCP1 cells*. Cancer Biology & Therapy, 2009. **8**(9): p. 846-853.

93. Hogan, C., et al., *Elevated levels of oncogenic protein kinase pim-1 induce the p53 pathway in cultured cells and correlate with increased mdm2 in mantle cell lymphoma*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(26): p. 18012-18023.
94. Zhang, Y., Z. Wang, and N.S. Magnuson, *Pim-1 kinase-dependent phosphorylation of p21Cip1/WAF1 regulates its stability and cellular localization in H1299 cells*. Mol Cancer Res, 2007. **5**(9): p. 909-22.
95. Morishita, D., et al., *Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27Kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels*. Cancer Res, 2008. **68**(13): p. 5076-85.
96. Maga, G. and U. Hubscher, *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners*. Journal of Cell Science, 2003. **116**(15): p. 3051-3060.
97. Mochizuki, T., et al., *Physical and functional interactions between Pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the Pim-1-mediated activation of the c-Myc signaling pathway*. J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18659-66.
98. Bachmann, M., et al., *The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 directly phosphorylates and activates the G2/M specific phosphatase Cdc25C*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(3): p. 430-43.
99. Bachmann, M., et al., *The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 phosphorylates and inhibits the activity of Cdc25C-associated kinase 1 (C-TAK1): a novel role for Pim-1 at the G2/M cell cycle checkpoint*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 48319-28.
100. Bhattacharya, N., et al., *Pim-1 associates with protein complexes necessary for mitosis*. Chromosoma, 2002. **111**(2): p. 80-95.
101. Roh, M., et al., *Overexpression of the oncogenic kinase Pim-1 leads to genomic instability*. Cancer Research, 2003. **63**(23): p. 8079-8084.
102. Schell, B. and S. Linder, *Magnetisierte Monozyten: Isolation, Mikroinjektion und Stimulation primärer humaner Monozyten und Makrophagen*. Immunologie Aktuell, 2001. **1**(6): p. 152-158.
103. Johnston, R.B., *Current Concepts - Immunology - Monocytes and Macrophages*. New England Journal of Medicine, 1988. **318**(12): p. 747-752.
104. Murray, P.J. and T.A. Wynn, *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 723-37.
105. Glass, C.K. and J.L. Witztum, *Atherosclerosis: The road ahead*. Cell, 2001. **104**(4): p. 503-516.
106. Murphy, K.M.T., P.; Walport, M., *Janeway Immunologie*. Vol. 7. 2014: Springer-Verlag.
107. Arora, S., et al., *Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases*. Immunobiology, 2018. **223**(4-5): p. 383-396.
108. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
109. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 209-12.
110. Niedobitek, G., et al., *Tumor-associated macrophages. Function and differentiation*. Pathologie, 2015. **36**(5): p. 477-484.

111. Duluc, D., et al., *Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells*. *Blood*, 2007. **110**(13): p. 4319-4330.
112. Oeckinghaus, A., M.S. Hayden, and S. Ghosh, *Crosstalk in NF-kappa B signaling pathways*. *Nature Immunology*, 2011. **12**(8): p. 695-708.
113. Lawrence, T., *Coordinated Regulation of Signaling Pathways during Macrophage Activation*. *Microbiology Spectrum*, 2016. **4**(5).
114. Lehtonen, A., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-induced STAT5 activation and target-gene expression during human monocyte/macrophage differentiation*. *J Leukoc Biol*, 2002. **71**(3): p. 511-9.
115. Eferl, R. and E.F. Wagner, *AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis*. *Nature Reviews Cancer*, 2003. **3**(11): p. 859-868.
116. Satoh, T., et al., *The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection*. *Nature Immunology*, 2010. **11**(10): p. 936-U89.
117. Odegaard, J.I., et al., *Macrophage-specific PPAR gamma controls alternative activation and improves insulin resistance*. *Nature*, 2007. **447**(7148): p. 1116-U12.
118. Ruffell, D., et al., *A CREB-C/EBP beta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009. **106**(41): p. 17475-17480.
119. Mahat, D.B., et al., *Coordinated expression of tristetraprolin post-transcriptionally attenuates mitogenic induction of the oncogenic Ser/Thr kinase Pim-1*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e33194.
120. Vallania, F., et al., *Genome-wide discovery of functional transcription factor binding sites by comparative genomics: the case of Stat3*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(13): p. 5117-22.
121. Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T., *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Vol. 1,2, and 3. 1989, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
122. Woodcock, D.M., et al., *Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants*. *Nucleic Acids Res*, 1989. **17**(9): p. 3469-78.
123. Bertani, G., *Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1951. **62**(3): p. 293-300.
124. Griffith, F., *The Significance of Pneumococcal Types*. *J Hyg (Lond)*, 1928. **27**(2): p. 113-59.
125. Gstraunthaler, G. and T. Lindl, *Zell- und Gewebekultur. Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. Vol. 7. 2013, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
126. Gey, G.O., W.D. Coffman, and M.T. Kubicek, *Tissue Culture Studies of the Proliferative Capacity of Cervical Carcinoma and Normal Epithelium*. *Cancer Research*, 1952. **12**(4): p. 264-265.
127. Aden, D.P., et al., *Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line*. *Nature*, 1979. **282**(5739): p. 615-6.
128. Lopez-Terrada, D., et al., *Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line*. *Hum Pathol*, 2009. **40**(10): p. 1512-5.

129. Tom, B.H., et al., *Human colon adenocarcinoma cells. II. Tumorigenic and organoid expression in vivo and in vitro*. J Natl Cancer Inst, 1977. **58**(5): p. 1507-12.
130. Fogh, J., J.M. Fogh, and T. Orfeo, *One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice*. J Natl Cancer Inst, 1977. **59**(1): p. 221-6.
131. Banfalvi, G., *Cell cycle synchronization of animal cells and nuclei by centrifugal elutriation*. Nature Protocols, 2008. **3**(4): p. 663-673.
132. Bensusan, O., *Inhibiting eukaryotic transcription. Which compound to choose? How to evaluate its activity?* Transcription, 2011. **2**(3): p. 103-108.
133. Schneider-Poetsch, T., et al., *Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin*. Nature Chemical Biology, 2010. **6**(3): p. 209-217.
134. Qin, H., et al., *Lysosomal and proteasomal degradation play distinct roles in the life cycle of Cx43 in gap junctional intercellular communication-deficient and -competent breast tumor cells*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(32): p. 30005-30014.
135. Tanaka, R.D., et al., *Inhibition of lysosomal protein degradation inhibits the basal degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase*. J Lipid Res, 1986. **27**(3): p. 261-73.
136. Tulchin, N., L. Ornstein, and B.J. Davis, *A microgel system for disc electrophoresis*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 485-90.
137. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
138. Gould, S.J. and S. Subramani, *Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology*. Anal Biochem, 1988. **175**(1): p. 5-13.
139. Shifera, A.S. and J.A. Hardin, *Factors modulating expression of Renilla luciferase from control plasmids used in luciferase reporter gene assays*. Anal Biochem, 2010. **396**(2): p. 167-72.
140. Thorne, N., J. Inglese, and D.S. Auld, *Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology*. Chemistry & Biology, 2010. **17**(6): p. 646-657.
141. Tsanev, R., *Direct spectrophotometric analysis of ribonucleic acid fractionation by agar-gel electrophoresis*. Biochim Biophys Acta, 1965. **103**(3): p. 374-82.
142. Smith, H.O. and K.W. Wilcox, *A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. I. Purification and general properties*. J Mol Biol, 1970. **51**(2): p. 379-91.
143. Danna, K. and D. Nathans, *Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of Hemophilus influenzae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(12): p. 2913-7.
144. Gibson, D.G., et al., *Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases*. Nat Methods, 2009. **6**(5): p. 343-5.
145. Baltimore, D., *RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses*. Nature, 1970. **226**(5252): p. 1209-11.
146. Temin, H.M. and S. Mizutani, *RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus*. Nature, 1970. **226**(5252): p. 1211-3.

147. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
148. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
149. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nature Methods, 2012. **9**(7): p. 671-675.
150. Heinz, S., et al., *Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities*. Molecular Cell, 2010. **38**(4): p. 576-589.
151. Farre, D., et al., *Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN*. Nucleic Acids Research, 2003. **31**(13): p. 3651-3653.
152. Stine, J.E., et al., *The HMG-CoA reductase inhibitor, simvastatin, has anti-tumorigenic effects in ovarian cancer cell lines and a genetically engineered serous ovarian cancer mouse model*. Gynecologic Oncology, 2015. **137**: p. 63-+.
153. Fang, Z., et al., *Simvastatin inhibits renal cancer cell growth and metastasis via AKT/mTOR, ERK and JAK2/STAT3 pathway*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e62823.
154. Block, K.M., et al., *IL-6 Stimulates STAT3 and Pim-1 Kinase in Pancreatic Cancer Cell Lines*. Pancreas, 2012. **41**(5): p. 773-781.
155. Ivanov, V.N. and T.K. Hei, *Regulation of apoptosis in human melanoma and neuroblastoma cells by statins, sodium arsenite and TRAIL: a role of combined treatment versus monotherapy*. Apoptosis, 2011. **16**(12): p. 1268-84.
156. Li, Y., M. Song, and M. Kiledjian, *Differential utilization of decapping enzymes in mammalian mRNA decay pathways*. RNA, 2011. **17**(3): p. 419-28.
157. Rudd, M.D. and D.S. Luse, *Amanitin greatly reduces the rate of transcription by RNA polymerase II ternary complexes but fails to inhibit some transcript cleavage modes*. J Biol Chem, 1996. **271**(35): p. 21549-58.
158. Klionsky, D.J., *Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(11): p. 931-7.
159. Yamada, E. and R. Singh, *Mapping autophagy on to your metabolic radar*. Diabetes, 2012. **61**(2): p. 272-80.
160. Notarnicola, M., V. Tutino, and M.G. Caruso, *Tumor-Induced Alterations in Lipid Metabolism*. Current Medicinal Chemistry, 2014. **21**(24): p. 2729-2733.
161. Fritz, V., et al., *Metabolic intervention on lipid synthesis converging pathways abrogates prostate cancer growth*. Oncogene, 2013. **32**(42): p. 5101-5110.
162. Hirsch, H.A., et al., *A Transcriptional Signature and Common Gene Networks Link Cancer with Lipid Metabolism and Diverse Human Diseases*. Cancer Cell, 2010. **17**(4): p. 348-361.
163. Freed-Pastor, W.A., et al., *Mutant p53 Disrupts Mammary Tissue Architecture via the Mevalonate Pathway*. Cell, 2012. **148**(1-2): p. 244-258.
164. Hentosh, P., et al., *Sterol-independent regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in tumor cells*. Mol Carcinog, 2001. **32**(3): p. 154-66.
165. Li, Y.C., et al., *Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents*. Am J Pathol, 2006. **168**(4): p. 1107-18; quiz 1404-5.

166. Malenda, A., et al., *Statins impair glucose uptake in tumor cells*. Neoplasia, 2012. **14**(4): p. 311-23.
167. Hu, M. and B. Tomlinson, *Evaluation of the pharmacokinetics and drug interactions of the two recently developed statins, rosuvastatin and pitavastatin*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2014. **10**(1): p. 51-65.
168. Karagkounis, G., et al., *Simvastatin enhances radiation sensitivity of colorectal cancer cells*. Surgical Endoscopy and Other Interventional Techniques, 2018. **32**(3): p. 1533-1539.
169. Zhong, S.L., et al., *Statin use and mortality in cancer patients: Systematic review and meta-analysis of observational studies*. Cancer Treatment Reviews, 2015. **41**(6): p. 554-567.
170. Platz, E.A., et al., *Statin drugs and risk of advanced prostate cancer*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(24): p. 1819-25.
171. Murtola, T.J., et al., *Statin use and breast cancer survival: a nationwide cohort study from Finland*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e110231.
172. Ahern, T.P., et al., *Statins and breast cancer prognosis: evidence and opportunities*. Lancet Oncol, 2014. **15**(10): p. e461-8.
173. Ahern, T.P., et al., *Statin prescriptions and breast cancer recurrence risk: a Danish nationwide prospective cohort study*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(19): p. 1461-8.
174. Pradelli, D., et al., *Statins and primary liver cancer: a meta-analysis of observational studies*. European Journal of Cancer Prevention, 2013. **22**(3): p. 229-234.
175. Lonardo, A. and P. Loria, *Potential for statins in the chemoprevention and management of hepatocellular carcinoma*. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2012. **27**(11): p. 1654-1664.
176. Liu, Y.Q., et al., *Association between statin use and colorectal cancer risk: a meta-analysis of 42 studies*. Cancer Causes & Control, 2014. **25**(2): p. 237-249.
177. Thibault, A., et al., *Phase I study of lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway, in patients with cancer*. Clin Cancer Res, 1996. **2**(3): p. 483-91.
178. Feleszko, W., et al., *Potentiated antitumour effects of cisplatin and lovastatin against MmB16 melanoma in mice*. Eur J Cancer, 1998. **34**(3): p. 406-11.
179. Agarwal, B., et al., *Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(8): p. 2223-9.
180. Feleszko, W., et al., *Lovastatin potentiates antitumor activity and attenuates cardiotoxicity of doxorubicin in three tumor models in mice*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 2044-52.
181. Kim, S.T., et al., *Simvastatin plus capecitabine-cisplatin versus placebo plus capecitabine-cisplatin in patients with previously untreated advanced gastric cancer: A double-blind randomised phase 3 study*. European Journal of Cancer, 2014. **50**(16): p. 2822-2830.
182. Vinayak, S., et al., *A clinical trial of lovastatin for modification of biomarkers associated with breast cancer risk*. Breast Cancer Research and Treatment, 2013. **142**(2): p. 389-398.
183. Silva, M., et al., *Meta-analysis of drug-induced adverse events associated with intensive-dose statin therapy*. Clinical Therapeutics, 2007. **29**(2): p. 253-260.

184. de Denu, S., et al., *Statins and liver toxicity: A meta-analysis*. *Pharmacotherapy*, 2004. **24**(5): p. 584-591.
185. Macedo, A.F., et al., *Unintended effects of statins from observational studies in the general population: systematic review and meta-analysis*. *Bmc Medicine*, 2014. **12**.
186. Jacobs, D., et al., *Report of the Conference on Low Blood Cholesterol: Mortality Associations*. *Circulation*, 1992. **86**(3): p. 1046-60.
187. Kritchevsky, S.B., *Dietary lipids and the low blood cholesterol-cancer association*. *Am J Epidemiol*, 1992. **135**(5): p. 509-20.
188. Eichholzer, M., et al., *Association of low plasma cholesterol with mortality for cancer at various sites in men: 17-y follow-up of the prospective Basel study*. *Am J Clin Nutr*, 2000. **71**(2): p. 569-74.
189. Gbelcova, H., et al., *Variability in statin-induced changes in gene expression profiles of pancreatic cancer*. *Scientific Reports*, 2017. **7**.
190. Bjarnadottir, O., et al., *Global Transcriptional Changes Following Statin Treatment in Breast Cancer*. *Clinical Cancer Research*, 2015. **21**(15): p. 3402-3411.
191. Tuckow, A.P., et al., *Simvastatin represses protein synthesis in the muscle-derived C(2)C(1)(2) cell line with a concomitant reduction in eukaryotic initiation factor 2B expression*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011. **300**(3): p. E564-70.
192. Campbell, M.J., et al., *Breast cancer growth prevention by statins*. *Cancer Research*, 2006. **66**(17): p. 8707-8714.
193. Coller, J. and R. Parker, *Eukaryotic mRNA decapping*. *Annu Rev Biochem*, 2004. **73**: p. 861-90.
194. Coller, J. and R. Parker, *Eukaryotic mRNA decapping*. *Annual Review of Biochemistry*, 2004. **73**: p. 861-890.
195. Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer, *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs*. *Cell*, 2009. **136**(4): p. 642-55.
196. Wang, Y., et al., *Downregulation of microRNA33a promotes cyclindependent kinase 6, cyclin D1 and PIM1 expression and gastric cancer cell proliferation*. *Mol Med Rep*, 2015.
197. Kosmidou, I., et al., *Statin Treatment and 3' Polyadenylation of eNOS mRNA*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2007. **27**(12): p. 2642-2649.
198. Rodrigues, A.C., et al., *Decreased ABCB1 mRNA expression induced by atorvastatin results from enhanced mRNA degradation in HepG2 cells*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009. **37**(3-4): p. 486-491.
199. Spilka, R., et al., *Eukaryotic translation initiation factors in cancer development and progression*. *Cancer Letters*, 2013. **340**(1): p. 9-21.
200. Ali, M.U., et al., *Eukaryotic translation initiation factors and cancer*. *Tumor Biology*, 2017. **39**(6): p. 1-19.
201. Jackson, R.J., C.U.T. Hellen, and T.V. Pestova, *The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010. **11**(2): p. 113-127.
202. Sonenberg, N. and A.G. Hinnebusch, *Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets*. *Cell*, 2009. **136**(4): p. 731-745.

203. Pickering, B.M. and A.E. Willis, *The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease*. Semin Cell Dev Biol, 2005. **16**(1): p. 39-47.
204. Rabkin, S.W., P. Lodha, and J.Y. Kong, *Reduction of protein synthesis and statin-induced cardiomyocyte cell death*. Cardiovascular Toxicology, 2007. **7**(1): p. 1-9.
205. Woodard, J., et al., *Statin-dependent suppression of the Akt/mammalian target of rapamycin signaling cascade and programmed cell death 4 up-regulation in renal cell carcinoma*. Clinical Cancer Research, 2008. **14**(14): p. 4640-4649.
206. Dong, X., et al., *Quantitative proteomic analysis revealed lovastatin-induced perturbation of cellular pathways in HL-60 cells*. J Proteome Res, 2011. **10**(12): p. 5463-71.
207. Li, W.J., et al., *Simvastatin exerts anti-hepatitis B virus activity by inhibiting expression of minichromosome maintenance protein 7 in HepG2.2.15 cells*. Molecular Medicine Reports, 2016. **14**(6): p. 5334-5342.
208. Beelman, C.A. and R. Parker, *Differential-Effects of Translational Inhibition in Cis and in Trans on the Decay of the Unstable Yeast Mfa2 Messenger-Rna*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(13): p. 9687-9692.
209. Schwartz, D.C. and R. Parker, *Mutations in translation initiation factors lead to increased rates of deadenylation and decapping of mRNAs in Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology, 1999. **19**(8): p. 5247-5256.
210. Muhlrads, D., C.J. Decker, and R. Parker, *Turnover Mechanisms of the Stable Yeast Pgc1 Messenger-Rna*. Molecular and Cellular Biology, 1995. **15**(4): p. 2145-2156.
211. Brook, M. and N.K. Gray, *The role of mammalian poly(A)-binding proteins in coordinating mRNA turnover*. Biochem Soc Trans, 2012. **40**(4): p. 856-64.
212. Nishimura, T., et al., *The eIF4E-Binding Protein 4E-T Is a Component of the mRNA Decay Machinery that Bridges the 5' and 3' Termini of Target mRNAs*. Cell Reports, 2015. **11**(9): p. 1425-1436.
213. Rao, S., et al., *Lovastatin-mediated G(1) arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(14): p. 7797-7802.
214. Vosper, J., et al., *Statin-induced depletion of geranylgeranyl pyrophosphate inhibits cell proliferation by a novel pathway of Skp2 degradation*. Oncotarget, 2014. **6**(5): p. 2889-2902.
215. Wojcik, C., et al., *Lovastatin and simvastatin are modulators of the proteasome*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2000. **32**(9): p. 957-965.
216. Seeler, J.S. and A. Dejean, *SUMO and the robustness of cancer*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(3): p. 184-197.
217. Lawrence, T. and G. Natoli, *Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity*. Nature Reviews Immunology, 2011. **11**(11): p. 750-761.

Anhang

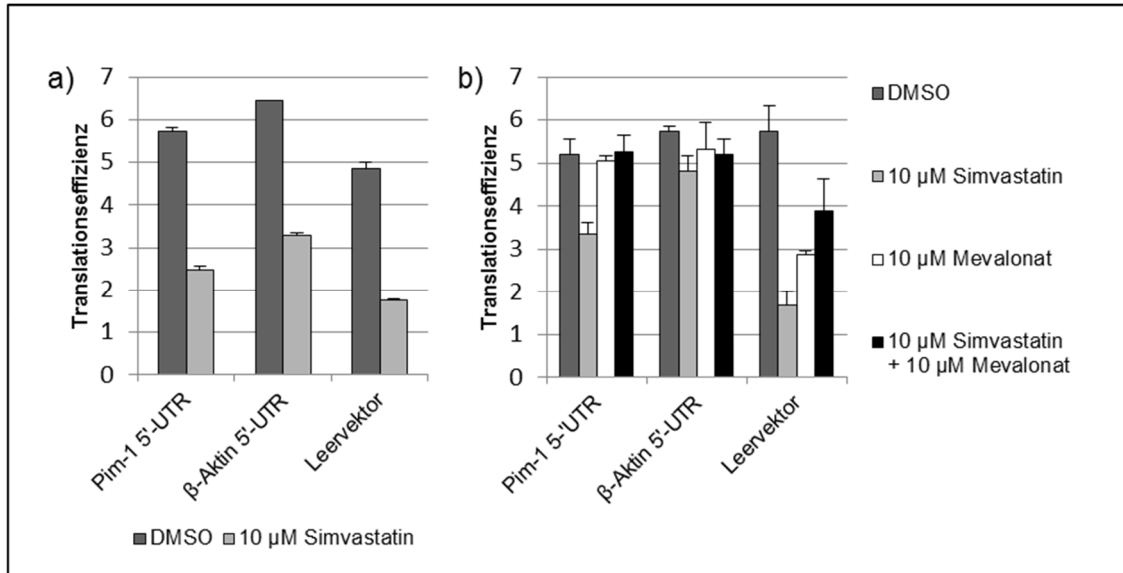


Abb.32: Dual-Luciferase-Assay. Transfektion verschiedener pFR_HCV_xb 5'-UTR-Konstrukte (+Pim-1 5'-UTR, + β -Aktin 5'-UTR und pFR_HCV_xb Leervektor) in HepG2 Zellen zur Messung der Translations-effizienz (Firefly-Luciferase) normiert auf die Renilla-Luciferase (Transfektionskontrolle) und das Firefly-Luciferase Hintergrundsignal (pFR_HCV_xb Leervektor ohne HSV TK-Promotor). Die Zellen wurden für 48 Stunden entweder mit a) 10 μ M Simvastatin (hellgrau) oder DMSO (dunkelgrau) ($n=16$) und in b) mit 10 μ M Simvastatin (hellgrau), 10 μ M Mevalonat (weiß), 10 μ M Simvastatin + 10 μ M Mevalonat (schwarz) oder DMSO (dunkelgrau) behandelt ($n=3$ bis 5). Der pFR_HCV_xb Leervektor diente als Kontrolle des Statin-Einflusses auf das Plasmidbackbone. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus n unabhängigen Zellproben.

pFR_HCV_xb+Pim-1-STAT3 BS Wildtyp

Gesamtvektor: 6633 nt

5297 5' -

CCCTTCCAGAAATCAGGATTCGCTGGTGCCTTTTGCATTTCTAAAATGGGAATCCCGTG
GCTGAGCTTTTAGCCGGCCGGAACGACTGAGGGCTGCATCCCTTTCCCGCAGGAGCGGG
GCTCCCGCCTCCAGTTCTGTTCCAGGCCTGACTCCTCCACTCCCTCCGTGACTCATGTC
CTGCGGATCCTTCGCCCCGACGCGCCCCCAACACACAAACCCCCAGAATCCGCCCC
AGCCTACAGCGCGACGTCAGCCCGCCCCAGCCGACTTGGAGGTCTCGGGTCTGAGTCAC
ACAGAAAGACCACCCTCGTTCGGCATCCCCACACACAGTCCGACACCCGGCGCGCCGGCC
TCCCCGCCTGACACACTAACGCCCGTCGTCTCCGCGCAACTTGTTATGCTCCGGCTCGA
GCCCTTGACCCAAAACCCTCAGCGAAACGGAGAGCCGCAGAGCCGGCCTCGGGCGGCCT
TTGATGGCTTTTGTATTGTTTGGGTTTGAATCGATACGCCCTCCCCATCCTTCCTCCC
TCGCGGCCCTACACCCAGCTCCCGCCTCCCTCACGCCCGCGCCCTCCCCCTCATT
TTGGCGCCTTTTCCTTCCCGCCACGTCGTGGCGGCGTAGAGACCATCTGACCGCGAGA
GCTGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGCGCCGAGTTATGCAGATCAATCGGCCTCTGGTTGG
CTGGAGTAGCGCTGGCAGGGGCGGGGCGGGGCGCGGCCACAGAGCGCGCGGGGCGGGG
GCCGAGGGGAGTCGCCAGTCCCGCCGCTTCCCCACCCCTCTCCTCCCTCGGCCGGCC
CGGCAGCCCTGCTCCCCGCCTTGGCCTCCCGGAGAGGCCCGCCCCGTCCCCGCCGCC
GCGCCCTCCCCGCGCGCCCTCCCCGCCGGCGCGCTCCTCCCTTTACTCCTGGCTGCGG
GGCAGCCGGGCGTCTGCTGCAGCGCCGCGGTGGCTGAGGAGGCCCGAGAGGAGTCGG
TGGCAGCGGCGGGCGGGACCGGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACCACT
AGCCTCCTGCCCGCGGGCGCTGCCGACGAGCCCCACGAGCCGCTCACCCGCGGTTCT
CAGCGCTGCCCGACCCCGCTGGCGCGCCCTCCCGCCGAGTCCCGGCAGCGCCCTCAG
TTGTCCTCCGACTCGCCCTCGGCCTTCCGCGCCAGCCGCAGCCACAGCCGCAACGCCAC
CCGCAGCCACAGCCACAGCCACAGCCCCAGGCATAGCCTTCGGCACAGCCCCGGCTCCG
GCTCCTGCGGCAGCTCCTCTGGGCACCGTCCCTGCGCCGACATCCTGGAGGTTGGGATG

-20 3'

STAT3 Bindestelle: gelb und unterstrichen

Pim-1 Promotorbereich: unterstrichen

Pim-1 5'-UTR: nicht unterstrichen

Startcodons: hellblau

***Pim-1* cDNA Wildtyp Sequenz (NM_002648.2) kloniert in pCMV6-XL4 Vektor**

Gesamtgröße: 2648 nt

5' -

CCCGAGAGGAGTCGGTGGCAGCGGCGGCGGGACCGGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA
GCAGCAACCACTAGCCTCCTGCCCCGCGGCGCTGCCGCACGAGCCCCACGAGCCGCTCA
CCCCGCCGTTCTCAGCGCTGCCGACCCCGCTGGCGCGCCCTCCCGCCGCCAGTCCCGG
CAGCGCCCTCAGTTGTCTCCGACTCGCCCTCGGCCTTCCGCGCCAGCCGCAGCCACAG
CCGCAACGCCACCCGCAGCCACAGCCACAGCCACAGCCCCAGGCATAGCCTTCGGCACA
GCCCCGGCTCCGGCTCCTGCGGCAGCTCCTCTGGGCACCGTCCCTGCGCCGACATCCTG
GAGGTTGGGATGCTCTTGTCCAAAATCAACTCGCTTGCCACCTGCGCGCCGCGCCCTG
CAACGACCTGCACGCCACCAAGCTGGCGCCCGGCAAGGAGAAGGAGCCCCTGGAGTCGC
AGTACCAGGTGGGCCCCGCTACTGGGCAGCGGCGGCTTCGGCTCGGTCTACTCAGGCATC
CGCGTCTCCGACAACCTTGCCGGTGGCCATCAAACACGTGGAGAAGGACCGGATTTCCGA
CTGGGGAGAGCTGCCTAATGGCACTCGAGTGCCCATGGAAGTGGTCTGCTGAAGAAGG
TGAGCTCGGGTTTCTCCGGCGTCATTAGGCTCCTGGACTGGTTCGAGAGGCCCGACAGT
TTCGTCTGATCCTGGAGAGGCCCGAGCCGGTGCAAGATCTCTTCGACTTCATCACGGA
AAGGGGAGCCCTGCAAGAGGAGCTGGCCCGCAGCTTCTTCTGGCAGGTGCTGGAGGCCG
TGCGGCACTGCCACAACCTGCGGGGTGCTCCACCGCGACATCAAGGACGAAAACATCCTT
ATCGACCTCAATCGCGGCGAGCTCAAGCTCATCGACTTCGGGTCGGGGGCGCTGCTCAA
GGACACCGTCTACACGGACTTCGATGGGACCCGAGTGTATAGCCCTCCAGAGTGGATCC
GCTACCATCGCTACCATGGCAGGTCGGCGGCAGTCTGGTCCCTGGGGATCCTGCTGTAT
GATATGGTGTGTGGAGATATTCTTTTCGAGCATGACGAAGAGATCATCAGGGGCCAGGT
TTTCTTCAGGCAGAGGGTCTCTTCAGAATGTCAGCATCTCATTAGATGGTGCTTGGCCC
TGAGACCATCAGATAGGCCAACCTTCGAAGAAATCCAGAACCATCCATGGATGCAAGAT
GTTCTCCTGCCCCAGGAAACTGCTGAGATCCACCTCCACAGCCTGTCGCCGGGGGCCAG
CAAATAGCAGCCTTTCTGGCAGGTCTCCCTCTCTTGTTCAGATGCCCGAGGGAGGGGA
AGCTTCTGTCTCCAGCTTCCCAGTACCAGTGACACGTCTCGCCAAGCAGGACAGTGCT
TGATACAGGAACAACATTTACAACCTCATTCCAGATCCCAGGCCCTGGAGGCTGCCTCC
CAACAGTGGGGAAGAGTGACTCTCCAGGGGTCTAGGCCTCAACTCCTCCCATAGATAC
TCTCTTCTTCTCATAGGTGTCCAGCATTGCTGGACTCTGAAATATCCCGGGGGTGGGGG
GTGGGGGTGGGTGAGAACCCTGCCATGGAAGTGTCTTCTTTCATCATGAGTTCGCTGAA
TGCCGCGATGGGTGAGGTAGGGGGGAAACAGGTTGGGATGGGATAGGACTAGCACCATT
TTAAGTCCCTGTCACCTCTTCCGACTCTTTCTGAGTGCCTTCTGTGGGGACTCCGGCTG
TGCTGGGAGAAATACTTGAACCTGCCTCTTTTACCTGCTGCTTCTCCAAAATCTGCCT

GGGTTTTGTTCCCTATTTTTCTCTCCTGTCCTCCCTCACCCCCTCCTTCATATGAAAGG
TGCCATGGAAGAGGCTACAGGGCCAAACGCTGAGCCACCTGCCCTTTTTTCTGCCTCCT
TTAGTAAACTCCGAGTGAACGGTCTTCCTTTTTGGTTTTTACTTAACTGTTTCAAAG
CCAAGACCTCACACACACAAAAATGCACAAACAATGCAATCAACAGAAAAGCTGTAAA
TGTGTGTACAGTTGGCATGGTAGTATACAAAAAGATTGTAGTGGATCTAATTTTTAAGA
AATTTTGCCTTTAAGTTATTTTACCTGTTTTTGTTCCTTGTTCCTTTGAAAGATGCGCATTC
TAACCTGGAGGTCAATGTTATGTATTTATTTATTTATTTATTTGGTTCCTTCCTATTC
CAAGCTTCCATAGCTGCTGCCCTAGTTTTCTTCCCTCCTTTCCTCCTCTGACTTGGGGA
CCTTTTGGGGGAGGGCTGCGACGCTTGCTCTGTTTGTGGGGTGACGGGACTCAGGCGGG
ACAGTGCTGCAGCTCCCTGGCTTCTGTGGGGCCCCCTCACCTACTTACCCAGGTGGGTCC
CGGCTCTGTGGGTGATGGGGAGGGGCATTGCTGACTGTGTATATAGGATAATTATGAAA
AGCAGTTCTGGATGGTGTGCCTTCCAGATCCTCTCTGGGGCTGTGTTTTGAGCAGCAGG
TAGCCTGCTGGTTTTATCTGAGTGAATACTGTACAGGGGAATAAAAGAGATCTTATTT
TTTTTTTTTATACTTGCGTTTTTTTGAATAAAAACCTTTTGTCTTAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA -3`

Startcodons: hellblau

HindIII Schnittstelle: gelb

TTP Konsensus-Bindemotiv: blau

miR-33a Bindestelle: unterstrichen

miR-33a Seed-Region: rot und unterstrichen

Abkürzungsverzeichnis

Abb: Abbildung

abs: absolut

AK: Antikörper

bp: Basenpaare

cm: Zentimeter

dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphat

g: Erdbeschleunigung

h: *hour*, Stunde

kb: Kilobasen

ng: Nanogramm

nm: Nanometer

ml: Milliliter

mM: Millimolar

min: Minute

p: *p-value*, p-Wert

pmol: Pikomol

rpm: *revolutions per minute*, Umdrehungen pro Minute

sek: Sekunde

SEM: *standart error of the mean*, Standardfehler des Mittelwerts

U: *unit*, Einheit

ÜN: Über Nacht

V: Volt

µg: Mikrogramm

µl: Mikroliter

µM: Mikromolar

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Roland K. Hartmann für die Betreuung und die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Arnold Grünweller für die intensive Betreuung, sowie die interessante Aufgabenstellung und das gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit. Des Weiteren möchte ich ihm für die Erstellung des Erstgutachtens danken.

Bei Prof. Dr. Achim Aigner möchte ich mich für Erstellung des Zweitgutachtens bedanken und für die Inspiration zu wichtigen Experimenten.

Dr. Kerstin Lange-Grünweller danke ich für die geduldige Einarbeitung in die verschiedenen Arbeitstechniken zu Beginn dieser Arbeit und die vielen Ratschläge bezüglich des Western Blots.

Ein großer Dank geht an Dr. Marcus Lechner für die Unterstützung bei bioinformatischen Fragestellungen sowie an Nadine B. Wäber für ihre Hilfe bei Klonierungen.

Ich danke Dr. Markus Gößringer ganz herzlich für die Unterstützung bei Abbildungen und die Protokollführung bei meiner Disputation.

Dr. Wigo Bertrams und Dr. Andreas Kaufmann möchte ich danken für die Einarbeitung in die verschiedenen Methoden zur Isolierung von Monozyten.

Des Weiteren danke ich Dr. Christin Müller für die Durchführung der Experimente zum *metabolic labeling*.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Hartmann bedanke ich mich für die ständige Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima sowie die amüsanten Mittagspausen. Wobei ich insbesondere Dr. Clemens Thölken und Eva-Maria Schäfer für die tollen Mittagspausen im Salädchen danken möchte.

Ich danke meinem „Adoptiv-Arbeitskreis“ Schlitzer für die tolle Zeit im Praktikum und das entgegengebrachte Verständnis hinsichtlich der Einarbeitung in die Methoden der Organischen Chemie.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner Stephan dafür bedanken, dass sie immer an mich geglaubt und zu mir gehalten haben.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Analyse der Statin-vermittelten Regulation der PIM1 Kinase in Krebszellen“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszweck gedient.

Marburg, den 13. Mai 2019

Aileen Weißer

