



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Etablierung eines Live-Cell-RNAi-Screenings zum Nachweis
nukleärer Phänotypen nach siRNA-Silencing an Cisplatin-sensitiven
und -resistenten Melanomzellen**

Autor: Könül Pasha
Institut / Klinik: Chirurgische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. M. Keese

Das maligne Melanom, ist ein bösartiger Tumor der Melanozyten. Die Inzidenz ist in den letzten Jahrzehnten stetig gestiegen, in den letzten 30 Jahren haben sich die Neuerkrankungszahlen mindestens verdreifacht. Nur die vollständige chirurgische Exzision in den frühen Stadien verspricht Heilung. Da sich bisher die Chemotherapie in den fortgeschrittenen Stadien der Tumorerkrankungen als wenig effizient erwiesen hat, wird die Erforschung neuer gezielter Therapieansätze angestrebt.

Die differentielle Expression bestimmter Gene und die damit verbundene Veränderungen auf Proteinebene in der Zelle kann therapeutisch beeinflusst werden. Hierdurch können auch Gene in ihrer Funktion verändert werden, die für das Überleben des Krebszellklons essenziell sind. RNA-Interferenz ist ein von Natur aus in den eukaryotischen Zellen vorkommender Mechanismus der gezielten Gen-Stilllegung (sog. Gene silencing). Der Begriff siRNA- „small interfering RNA“ beschreibt kurze, doppelsträngige RNA-Segmente, die nach der Transfektion in die eukaryote Zelle die komplementäre RNA-Sequenz, u.a. die mRNA zerschneiden und unbrauchbar machen können.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Live-Cell-high-Content-RNAi-Screen etabliert, der die Identifizierung neuer molekularer und zielgerichteter Ansatzpunkte an Cisplatin-sensitiven und -resistenten MeWo-Zelllinien, sowie an einer Melanozyten-Zelllinie zum Ziel hatte. Die Zellen wurden mit insgesamt 91 siRNAs transfiziert und die phänotypischen Veränderungen der Zellkerne, wie Zellteilung, Zelltod und Migration, über 60 Stunden unter Time-Lapse-Microscopy beobachtet. Mit dieser Methode wurden die Cisplatin-resistenten und -sensitiven MeWo-Zellen und die Melanozyten-Zelllinien nach einer automatisierten Image-Analyse und einer visuellen Inspektion verglichen.

Es wurden insgesamt 22 Gene identifiziert, die nach der spezifischen Exposition mit siRNAs an Cisplatin-sensitiven- oder Cisplatin-resistenten MeWo-Zellen deutliche phänotypische Abnormalitäten aufwiesen. Der Knockdown von insgesamt sieben Gene (PRC1, PTTG1, NUDCD1, DLG7, SPC25, NDC80, HOXA9) führte in beiden MeWo-Zelllinien zu differenzierbaren nukleären Phänotypen. In der Cisplatin-sensitiven Zelllinie konnten neun (RFC4, KPNA2, CDC2, OGG1, CDKN3, EXO1, STMN2, EMX2, TXNIP), in der Cisplatin-resistenten MeWo-Zelllinie sechs weitere Gene (CENPF, CKS2, NEK2, DHFR, CCT4, TARS) identifiziert werden.

Die transfizierten Zellen wurden mit den nicht transfizierten Zellen verglichen und nach folgenden Eigenschaften klassifiziert:

- Die Änderung der Zellzahl
- Die Beeinflussung der Zellmobilität
- Die Kondensation des Chromatins im Zellkern
- Apoptose

Ein analoger RNAi-Screen an den Melanozyten ergab keine phänotypischen Auffälligkeiten. Somit konnte nachgewiesen werden, dass mit Hilfe von siRNA-Screening tumorspezifische Gene, die zu differenzierten phänotypischen Auffälligkeiten führen, identifiziert werden können. Diese Gene könnten als potenzielle Ansatzpunkte für die zielgerichtete Therapie des Melanoms dienen.

Die RNAi-induzierte Suppression der Genexpression kann also dazu beitragen, die Funktion einzelner Gene in biologischen Systemen zu beschreiben. Der Einsatz der siRNA-Technologien und des Hochdurchsatz-Screenings wird in weiterführenden Projekten - an verschiedenen Zelllinien adaptiert - durchgeführt werden und damit zur Entdeckung zielgerichteter, individualisierter Therapien führen.